

**Der Codierungs-Gehalt der COB-Region
der mitochondrialen DNS
von *Saccharomyces cerevisiae***

Albert Haid

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551927_0073

Der Codierungs-Gehalt der COB-Region
der mitochondrialen DNS
von *Saccharomyces cerevisiae*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Albert Haid

München 1979



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. R. J. Schweyen

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 1979

Abkürzungsverzeichnis:

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CAP	Chloramphenicol
cpm	counts (Zerfälle) pro Minute
CHX	Cycloheximid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
mtDNS	mitochondriale DNS
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
M	Molare Konzentration
MG	Molekulargewicht
Min	Minute
mM	millimolare Konzentration
OD	optische Dichte
PBD	2-Phenyl-5-(4-diphenyl)-1,3,4-Oxadiazol
PEP	Phosphoenolpyruvat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
poly(A)	Polyadenylsäure
poly(U)	Polyuridylsäure
POPOP	1,4-Di-2-(5-Phenyloxazolyl)-Benzol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
QH ₂	Ubichinon (red.)
RNS	Ribonukleinsäure
mRNS	Messenger-RNS
mtRNS	mitochondriale RNS
rRNS	ribosomale RNS
tRNS	Transfer-RNS
rpm	Umdrehung pro Minute
S-30	30 000 x g Überstand von E. coli
SDS	Natriumlaurylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	Cethylphenoxypolyethoxyäthanol
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

A.	Einleitung	1 - 5
B.	Material und Methoden	6 - 22
1.	Stämme	6
2.	Medien	7
3.	Chemikalien	9
4.	Methoden	9 - 22
4. 1	Aufzucht von Bakterien	10
4. 2	Präparation eines zellfreien Extrakts	10
4. 3	Zusammensetzung eines <u>in vitro</u> Protein- syntheseansatzes	11
4. 4	Bestimmung der Syntheseleistung des <u>in</u> <u>vitro</u> Systems	13
4. 5	Präparation von Hefemitochondrien	13
4. 6	Extraktion von RNS	14
4. 6. 1	Isolierung mitochondrialer RNS	14
4. 6. 2	Isolierung cytoplasmatischer RNS	15
4. 6. 3	Gewinnung von M12 Phagen RNS	15
4. 7.	Bestimmung der Reinheit und der Kon- zentration von RNS	15
4. 8	Elektrophorese der RNS	15
4. 9	Analyse <u>in vitro</u> synthetisierter Polypeptide	16
4. 9. 1	Gelelektrophoretische Auftrennung <u>in vitro</u> synthetisierter Polypeptide	16
4. 9. 2	Analyse der elektrophoretisierten Poly- peptide	17
4.10	Immunologische Analyse <u>in vitro</u> synthe- tisierter Polypeptide	17
4.10. 1	Immunpräzipitation	17
4.10. 2	Immundiffusion	18
4.11	Radioaktive Markierung mitochondrialer Translationsprodukte	19

4.11. 1	Markierung mit ^3H -Leucin oder ^{35}S -Methionin	19
4.11. 2	Markierung mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$	19
4.12	SDS-Elektrophorese in Polyacrylamid-Gradientengelen	20
4.13	Eindimensionale Peptidkartierung	21
4.14	Tieftemperaturspektroskopie	21
4.15	Sonstige Methoden	22
C.	Ergebnisse	23 - 46
Teil 1	Translation mitochondrialer RNS in einem zellfreien E. coli System	23 - 33
1.	Aufbau eines RNS-abhängigen Translations-systems	23
2.	Versuch der <u>in vitro</u> Synthese mitochondrial codierter Polypeptide	24
2. 1	Isolierung mitochondrialer RNS	24
2. 2	Optimierung der mtRNS-abhängigen Protein-synthese	26
2. 3	SDS-Gelelektrophorese <u>in vitro</u> synthetisierter Produkte	27
3.	Immunologische Analyse <u>in vitro</u> synthetisierter Mitochondrienpolypeptide	29
3. 1	Nachweis der Spezifität von Antiseren im Immundiffusionstest	29
3. 2	Immunpräzipitation von Polypeptiden nach mtRNS-abhängiger Proteinsynthese	30
3. 3	Gelelektrophoretische Analyse immunpräzipitierter Mitochondrienpolypeptide	30
Teil 2	Biochemische Analyse mitochondrialer Mutanten der COB-Region	34 - 46
4.	Die genetische Karte der COB-Region	36
5.	SDS-Gelelektrophorese mitochondrialer Trans-lationsprodukte	37
6.	Analyse weiterer phänotypischer Eigenschaften der cob ⁻ - Mutanten	38

7.	Abhängigkeit des Phänotyps der cob^- -Mutanten von ihrem Mutationsort	39
8.	Bestimmung der freien Mobilität des Apocytochroms <u>b</u> und seiner Fragmente	43
9.	Eindimensionale Peptidkartierung	45
9. 1	Charakterisierung der Verdauungsmuster mitochondrialer Translationsprodukte	45
9. 2	Charakterisierung der Verdauungsmuster der Apocytochrom <u>b</u> -Fragmente	45
D.	Diskussion	47 - 56
E.	Tabellen und Abbildungen	57 - 82
F.	Zusammenfassung	83 - 84
G.	Literaturverzeichnis	85 - 93

A. Einleitung

Die Biogenese der Mitochondrien ist ähnlich wie die der Chloroplasten nicht nur vom genetischen System des Zellkerns, sondern zusätzlich von einem zweiten abhängig, das in der Zellorganelle selbst lokalisiert ist. Es besteht bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* aus einer relativ kleinen ringförmigen DNS ($MG\ 5 \times 10^7$) und einem Transkriptions- und Translationsapparat, der alle mitochondriale RNS-Komponenten und etwa 5-10% des Proteins der Mitochondrien synthetisiert. Für den Aufbau funktionsfähiger Mitochondrien sind sowohl die mitochondriale Proteinsynthese als auch jene des Cytoplasmas essentiell (Borst P., 1972; Schatz und Mason, 1974).

Eine Hauptaufgabe des mitochondrialen genetischen Systems scheint die Translation hydrophober Polypeptide zu sein, die als Untereinheiten in den Enzymkomplexen der inneren Mitochondrienmembran integriert und für die Funktion der Zellatmung bzw. der oxydativen Phosphorylierung notwendig sind (Lloyd P., 1974). Pulsmarkierungen an ganzen Hefezellen mit spezifischen Inhibitoren der cytoplasmatischen bzw. der mitochondrialen Proteinsynthese und anschliessende immunologische oder elektrophoretische Analysen isolierter Membrankomplexe ermöglichten das Identifizieren dieser mitochondrialen Translationsprodukte:

- 1.) Die drei grössten Untereinheiten (von insgesamt sieben) der Cytochrom c Oxidase werden an den mitochondrialen Ribosomen synthetisiert. Ihre Molekulargewichte betragen 40 000 (I), 32 000 (II) und 22 000 (III). Die vier kleineren Polypeptide des Enzymkomplexes werden im Cytoplasma gebildet (Mason und Schatz, 1973).
- 2.) Vier von neun Polypeptiden des Oligomycin-sensitiven ATPase-Komplexes entstehen in den Mitochondrien. Sie besitzen Moleku-

largewichte von 29 000, 22 000, 12 000 und 7 000 (Tzagoloff et al. 1973).

3.) Der bc_1 -Komplex der Atmungskette (QH_2 -Cytochrom c Reduktase enthält ein (Katan et al. 1976) oder zwei (Weiss und Ziganke, 1974) Untereinheiten, die mitochondrial synthetisiert werden. Diese(s) konnte(n) als Apoprotein des Cytochroms b identifiziert werden. Sein (ihr) Molekulargewicht beträgt 30 000. Alle übrigen Polypeptide des Komplexes werden an cytoplasmatischen Ribosomen gebildet.

4.) Ein mitochondrial synthetisiertes Polypeptid (Var 1) mit bisher unbekannter Funktion ist vermutlich mit der kleinen Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen assoziiert (Groot et al. 1978). Sein Molekulargewicht variiert bei verschiedenen Hefestämmen zwischen 40 000 und 43 000.

Die Frage nach der Lokalisierung der Strukturgene dieser Polypeptide blieb lange Zeit offen. Mitochondrial synthetisierte Polypeptide könnten sowohl im Zellkern als auch in der mtDNS codiert sein. Es ergab sich allerdings kein Indiz für den Import grösserer Mengen von nuklearer mRNS in die Mitochondrien (Reijnders et al. 1972), so dass eine mitochondriale Codierung als wahrscheinlich angesehen werden konnte. Der Nachweis einer Synthese mitochondrialer Translationsprodukte in isolierten Mitochondrien (Poyton und Groot, 1975) sowie die Blockierung der mitochondrialen Proteinsynthese in vivo mit Hemmstoffen der mitochondrialen RNS-Synthese (Thomas und Williamson, 1971) stützten diese Anschauung.

In jüngster Zeit wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen eine grosse Zahl neuer mitochondrialer Mutanten (mit^-) von *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Tzagoloff et al. 1975; Slonimski und Tzagoloff, 1976; Groot Obbink et al. 1976; Schweyen et al. 1977), die funktionelle Defekte der Atmung und der oxydativen Phosphorylierung verursachen. mit^- -Mutanten haben die Befähigung verloren,

auf nicht-vergärbaren Kohlenstoffquellen, wie z. B. Glycerin oder Äthanol, zu wachsen, besitzen aber noch - im Gegensatz zu den bereits länger bekannten rho⁻ - Mutanten - ein intaktes mitochondriales Proteinsynthesystem. Diese Besonderheit eröffnete die Möglichkeit, Auswirkungen der mit⁻ - Mutationen auf die Synthese der mitochondrialen Translationsprodukte und deren Einbau in funktionsfähige Enzym-Komplexe zu studieren. Es konnte gezeigt werden, dass mit⁻ - Mutationen in der Regel einen spezifischen Ausfall der enzymatischen Aktivität in einem jener Membrankomplexe bewirken, die mitochondrial synthetisierte Untereinheiten enthalten (Tzagoloff et al. 1975). Deletions- und Rekombinationskartierung dieser Mutationen ermöglichten die Lokalisierung ihrer Mutationsorte auf der mtDNS. Dadurch wurden Genorte und Gencluster identifiziert, deren Gen oder Gene an der Biosynthese der Cytochrom c Oxidase (OXI 1, 2 und 3), der QH₂-Cytochrom c Reduktase (COB 1 und 2) sowie der Oligomycin-sensitiven ATPase (PHO 1 und 2) beteiligt sind (Abb. 1).

Diese Loci sind aber nicht notwendigerweise die Strukturgene der mitochondrial synthetisierten Enzym-Untereinheiten. Sie können auch DNS-Sequenzen mit regulatorischer Funktion darstellen, welche die Expression der Gene kontrollieren, die am Zusammenbau eines funktionsfähigen Enzym-Komplexes mitwirken.

Die Identifizierung eines Strukturgens erfordert deshalb den Nachweis, dass spezifische Änderungen in der Primärstruktur eines Polypeptides als Ergebnis von Mutationen mit bekanntem Kartierungsort innerhalb eines bestimmten Genlocus auftreten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, das oder die Gen(e) der mitochondrial synthetisierten Untereinheit des bc₁-Komplexes, dem Apocytochrom b, zu identifizieren. Dazu standen mit⁻ - Mutanten zur Verfügung, die einen spezifischen Aus-

fall der enzymatischen Aktivität der QH_2 -Cytochrom c Reduktase aufwiesen (cob^- - Mutanten). Ihre Mutationsorte liegen alle in einem als COB-Region bezeichneten Abschnitt der mtDNS, zwischen den Genorten OLI 1 und OLI 2 (Tzagoloff et al. 1976; Kotylak und Slonimski, 1976; Schweyen et al. 1977). Die genetischen Daten liessen bei Beginn der Arbeit auf zumindest zwei getrennte Gruppen von Mutationsorten (Cluster) schliessen, die mit COB 1 und COB 2 bezeichnet wurden. mit⁻ - Mutationen in jedem dieser Cluster führten zum Verlust oder zur Veränderung der spektroskopischen Eigenschaften des Cytochroms b.

Die experimentellen Befunde liessen allerdings noch keine schlüssigen Aussagen über den Codierungsinhalt der COB-Region zu. Die Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen konzentrierten sich deshalb in den letzten Jahren bevorzugt auf

- 1.) die Bestimmung der molekularen Länge der COB-Region und ihrer Codierungskapazität durch physikalische Kartierung mit Restriktionsenzymen
- 2.) die Erstellung einer detaillierteren genetischen Karte der COB-Region durch Isolierung, Kartierung und Bestimmung der phänotypischen Ausprägung von weiteren Mutationen in COB und
- 3.) auf die Identifizierung der im COB-Segment lokalisierten Gene durch Definition ihrer Funktion (Strukturgen(e) oder Gen(e) mit regulatorischer Funktion).

Der experimentelle Ansatz zum Studium der Beziehung der COB-Region und dem Cytochrom b Apoprotein in vorliegenden Untersuchungen war, eine grosse Zahl von kartierten Mutationsorten mit strukturellen Veränderungen im Protein zu korrelieren. Solche Veränderungen können allerdings nicht direkt, d.h. durch Bestimmung der Aminosäuresequenz von Mutantenprotein, analysiert werden. Versuche zur Reindarstellung von Apocytochrom b aus der inneren Mitochondrienmembran waren bisher bei Hefe ohne Erfolg.

Eine Analyse der mutativ veränderten Formen des Apocytochroms b konnte sich deshalb nur auf den Vergleich mit den bisher bekannten biochemischen Eigenschaften des Wildtyp-Proteins stützen. Die einzige Möglichkeit, Apocytochrom b unter der grossen Zahl der Mitochondrienproteine (ca. 200 - 300 verschiedene Species) zu erfassen, besteht in der gelelektrophoretischen Charakterisierung radioaktiv-markierter mitochondrialer Translationsprodukte. Ein mitochondrial gebildetes Polypeptid mit einem apparenten Molekulargewicht von 30 000 wurde von Weiss und Ziganke (1974) und von Katan et al. (1976) bei ihren Untersuchungen am bc_1 -Komplex von *Neurospora crassa* bzw. von Hefe als Apocytochrom b identifiziert.

Zur Lösung der Frage, ob cob^- -Mutationen den Verlust oder eine Veränderung dieses Polypeptids bewirken, können zwei, im methodischen Ansatz unterschiedliche Versuchsreihen eingesetzt werden:

- 1.) Die Analyse der in vivo synthetisierten mitochondrialen Translationsprodukte nach selektiver Markierung durch Ausschalten der cytoplasmatischen Proteinsynthese mit geeigneten Hemmstoffen.
- 2.) Der Aufbau eines zellfreien Systems und die Charakterisierung der in Abhängigkeit von isolierter mtRNS in vitro synthetisierten Polypeptide.

Die in vitro Proteinsynthese liefert im Vergleich zur erstgenannten Methodik direktere Hinweise, dass Strukturgene tatsächlich in der mtDNS lokalisiert sind. Zusätzlich erlaubt ihre Verwendung, mögliche Vorstufen der Polypeptide zu entdecken und zu charakterisieren. Diese Argumente sprachen dafür, die experimentellen Untersuchungen mit der Erstellung eines zellfreien Proteinsynthese-Systems zu beginnen und die Methodik der RNS-abhängigen in vitro Synthese zum Studium der Gen - Genprodukt - Beziehung einzusetzen.

B. Material und Methoden

1.) Stämme

a) Bakterienstämme:

E. coli K12, AB 301 (Hfr, λ^+ , met⁻, RNase I⁻)

b) Hefestämme:

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind in Tabelle I aufgeführt.

Die Mutanten G1334, G1370, G2286, G2494 wurden von Dr. P. Slonimski, die Mutante M 7-40 von Dr. A. Tzagoloff zur Verfügung gestellt.

Alle übrigen mitochondrialen Mutanten wurden von Dr. R.J. Schweyen isoliert

Nomenklatur:

mit⁻ bezeichnet mitochondriale Mutanten mit funktionsfähigem Proteinsyntheseapparat, welche die Befähigung, auf nicht-vergärbaren Substrat zu wachsen, verloren haben. In der Regel ist der enzymatische Defekt auf den Ausfall einer einzigen Funktion zurückzuführen (z. B. Cytochrom c Oxidase oder QH₂-Cytochrom c Reduktase). Das entsprechende Wildtyp-Allel wird mit⁺ benannt.

rho⁻ sind atmungsdefekte Mutanten, deren mitochondriale Proteinsynthese als Ergebnis einer Makrodeletion der mtDNA ausgefallen ist. Diese Mutantenklasse besitzt einen pleiotropen Phänotyp, der durch den gemeinsamen Ausfall von Cytochrom c Oxidase, QH₂-Cytochrom c Reduktase und Oligomycin-sensitiver ATPase charakterisiert ist.

rho⁺ bezeichnet Zellen mit intaktem mitochondrialen Genom und funktionsfähigem Proteinsynthesystem.

rho⁰ charakterisiert den vollständigen Verlust der mtDNA.

OLI 1 und OLI 2 benennen zwei mitochondriale Loci. Mutationen in diesen Loci führen zur Resistenz gegen das Antibiotikum Oligomycin.

op 1 bezeichnet eine Mutation im Kerngenom, welche die Funktion der mitochondrialen ATP-Translocase beeinflusst. Sie bewirkt in Kombination mit einer ρ^- -Mutation die Letalität der Zelle. Das Wildtyp-Allel wird OP 1 benannt.

2.) Medien

a) Medien für Bakterien

M-3 Medium

Antibiotic Medium 3 (Difco)		17,5	g
H ₂ O dest.	ad	1	l

Hefeextrakt-Medium

Hefeextrakt		10	g
KH ₂ PO ₄ (wasserfrei)		5,6	g
K ₂ HPO ₄ (wasserfrei)		28,9	g
Thiamin HCl		15	mg
Glukose (25 %)		50	ml
H ₂ O dest.	ad	1	l

Thiamin und Glukose werden nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

b) Medien für Hefen

YPD-Medium

Hefeextrakt		10	g
Pepton		20	g
Agar		20	g
Glukose		30	g
H ₂ O dest.	ad	1	l

Glukose wird nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

YPG-Medium

wie YPD-Medium, statt Glukose werden 30 ml Glycerin zugegeben.

YPGal-Medium

wie YPD-Medium, statt Glukose werden 20 g Galaktose zugegeben.

YNB-Medium (Minimalmedium)

Yeast Nitrogen Base (Difco)	6,7	g
Agar	15	g
Glukose	30	g
H ₂ O dest.	ad 1	l

Flüssigmedien

Als Flüssigmedien werden die beschriebenen Medien ohne Zusatz von Agar verwendet.

LSM-Medium ("low sulphate medium")

Stammlösungen:

Salze	(NH ₄)H ₂ PO ₄	60	g
	MgCl	1,9	g
	NH ₄ Cl	16,2	g
	KH ₂ PO ₄	10	g
	NaCl	1	g
	CaCl	1	g
	H ₂ O dest.	ad 900	ml
Spurenelemente	Borsäure	500	mg
	CaSO ₄	40	mg
	KJ	100	mg
	MnSO ₄	400	mg
	Na ₂ MoO ₄	200	mg
	ZnSO ₄	400	mg
	H ₂ O dest.	ad 1	l
Vitamine	Ca-pantothenat	80	mg
	Thiamin-HCl	80	mg
	Pyridoxin	80	mg
	Nicotinsäure	20	mg
	Biotin	0,8	mg
	H ₂ O dest.	ad 200	ml

Inositol-Lösung	Meso-Inositol	200	g
	H ₂ O dest.	ad 1	1
FeCl ₃ -Lösung	FeCl ₃ · 6 H ₂ O	200	mg
	H ₂ O dest.	ad 1	1

Zur Herstellung von LSM werden die autoklavierten Stammlösungen wie folgt gemischt:

Salze	90	ml
Spurenelemente	1	ml
Vitamine	5	ml
Inositol	1	ml
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	1	ml
H ₂ O dest.	ad 1	1

3.) Chemikalien

Alle Chemikalien waren vom höchsten verfügbaren Reinheitsgrad. Soweit nicht anders angegeben, wurden sie von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

BSA	Behring, Marburg
CAP	Bayer, Leverkusen
CHX	Serva, Heidelberg
DNase	Boehringer, Mannheim
DTT	Sigma, St. Louis
Fluorescamin	Hoffmann-La Roche, Basel
Helicase (β -Glucuronidase)	Boehringer, Mannheim
Methylglykoll	Riedel de-Haen, Seelze
Nagarse	Serva, Heidelberg
PEP	Calbiochem, San Diego
Polyacrylamid	BDH, Poole
Protein A	Deutsche Pharmacia, Freiburg
Pyruvatkinase	Calbiochem, San Diego
Sarkosyl NL-35	Ciba-Geigy, Basel

Sepharose G-25	Deutsche Pharmacia, Freiburg
Tris (Trizma Base)	Sigma, St. Louis
tRNS	Boehringer, Mannheim
Medien (Hefeextrakt, Pepton, Agar)	Difco, Detroit
Substanzen für die Elektro- phorese	Serva, Heidelberg
Radioaktive Substanzen	Amersham-Buchler, Braunschweig
Lösungsmittel und Szintil- latoren	Packard, Frankfurt

4.) Methoden

4.1 Aufzucht von Bakterien

Übernachtskulturen werden in Erlenmeyerkolben bei 37°C in M-3-Medien gezogen. Zur Aufzucht grösserer Mengen (10 l) wird Hefeextrakt-Medium verwendet. Bei einem Titer von $2 - 3 \times 10^8$ wird die Kultur auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert (ICN-Zentrifuge, 2 400 rpm, 30 Min). Die Bakterien werden zweimal mit TMK-Puffer (60 mM KCl, 10 mM Mg-azetat, 40 mM Tris-HCl, pH 7,6) gewaschen, 15 Min bei 12 000 rpm (Sorvall-Zentrifuge, SS 34 Rotor) abzentrifugiert und das gewonnene Pellet (ca. 1g/l) bei -80°C gelagert.

4.2 Präparation eines zellfreien Extrakts

Die Isolierung des zellfreien Extrakts folgt im wesentlichen der von Konings et al. (1970) beschriebenen Methode. Um Ribonukleasefreie Bedingungen zu erzielen, wurden alle Glasgeräte vor der Verwendung mindestens 18 Stunden bei 180°C hitzesterilisiert; Corex-Zentrifugengläser wurden mit 1 % Dichlordimethylsilan in Benzol silykonisiert, Plastikgefäße mit 0,025 % Diäthylpyrocarbonat gespült. Mit Ausnahme der Präinkubation erfolgen alle Arbeitsschritte bei 4°C. Gefrorene Bakterienzellen werden vollständig bei 0°C aufgetaut und mit der doppelten Menge Alcoa (A 301, polishing grade) im Mörser zerrieben. Sobald das Gemenge durch den Aufschluss feucht

wird, werden 50 μ l DNase (2 mg/ml) dazugegeben. Nach 15 Min werden die geöffneten Zellen in 10 ml TMK-Puffer, der zusätzlich 6 mM Mercaptoäthanol enthält, aufgenommen und 20 Min bei 12 000 rpm abzentrifugiert. Die oberen 7 ml des Überstandes werden abgenommen und 30 Min bei 21 000 rpm (Beckmann L2-50, 50 Ti-Rotor) zentrifugiert. Die mittlere Beschleunigung beträgt unter diesen Bedingungen 30 000 x g; deshalb bezeichnet man den nach dieser Zentrifugation erhaltenen Überstand als S-30 Überstand.

Dieser wird mit 0,5 ml "Energiegemisch" (40 mM ATP, 2,6 mM GTP, 18 mM PEP, Pyruvatkinase 120 μ l/ml, pH 7,0) 30 Min bei 37°C inkubiert. Anschliessend wird der präinkubierte Extrakt über Nacht gegen TMA-Puffer (60 mM NH_4Cl , 10 mM Mg-azetat, 6 mM Mercaptoäthanol, 40 mM Tris-HCl, pH 7,6) dialysiert. Nach der Dialyse werden die sich gelegentlich bildenden Präzipitate 30 Min bei 5 000 rpm abzentrifugiert.

Die RNS-Konzentration wird durch Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm spektrometrisch ermittelt (1 mg/ml = 25 OD_{260}). Extrakte mit einer RNS-Konzentration unter 6 mg/ml werden verworfen. Gute S-30-Präparationen werden aliquotiert und in flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Bei einigen Extraktpräparationen erfolgte die Entfernung der endogenen DNS mit Sepharose 4B-gekoppelter DNase nach der Methode von Moorman et al. (1976b).

4.3 Zusammensetzung eines *in vitro* Proteinsyntheseansatzes

Proteinsyntheseansatz:

tRNS (10 mg/ml)	10 μ l
Inkubationspuffer	75 μ l
Energiegemisch	50 μ l
19 kalte Aminosäuren (jede 1 mM)	20 μ l
zellfreier Extrakt	125 μ l
Leucovorin (Folinsäure, 12 mM)	8 μ l
H_2O	92 μ l

Ein Standard-Reaktionsansatz enthält von diesem Gemisch 50 μ l, sowie 10 μ l RNS und 5 μ l radioaktiv markierte Aminosäuren.

Inkubationspuffer:

2 M NH_4Cl	0,35 ml
2 M Tris HCl, pH 7,6	0,25 ml
1 M Mg-azetat	0,1 ml
Mercaptoäthanol	10 μl
DTT (0,6 M)	20 μl
PMSF (0,6 M)	20 μl
H_2O	1,3 ml

Energiemischung:

ATP (0,1 M)	0,6 ml
GTP (0,01 M)	0,4 ml
PEP (0,067 M)	0,4 ml
Pyruvatkinase (2mg/ml)	0,1 ml
mit KOH auf pH 7,0 eingestellt	

Endkonzentration im Standardansatz:

NH_4Cl	70 mM
Tris	65 mM
Mg^{++}	10 mM
ATP	4 mM
GTP	2,6mM
PEP	1,8mM
Pyruvatkinase	12 $\mu\text{g/ml}$
Aminosäuren	40 μM
tRNA	0,2 mg/ml
Mercaptoäthanol	6 mM
DTT	1 mM
Leucovorin	0,2mM
PMSF	1 mM

Im Kontrollansatz zur Bestimmung der endogenen Proteinsynthese werden an Stelle von RNS 10 μl Trispuffer, pH 7,6 zugesetzt. Von allen Ansätzen werden zu Beginn und Ende der Inkubation 10 μl Proben entnommen und auf Papierscheibchen (Whatmann 3 MM) getropft. Die Inkubation erfolgt im Wasserbad bei 37°C.

4.4 Bestimmung der Syntheseleistung des in vitro Systems

Als Mass für die Menge synthetisierter Proteine wird der Einbau radioaktiver Aminosäuren in TCA-fällbares, heisse TCA-beständiges Material verwendet (Nirenberg und Matthaei, 1961). Die Filterscheiben mit den eingetrockneten Proben werden für jeweils 15 Min nacheinander in folgenden Lösungen gewaschen: 5 % TCA bei Raumtemperatur, 5 % TCA bei 95°C, Äthanol : Äther (1 : 1) bei Raumtemperatur und Äther bei Raumtemperatur. Bei dieser Behandlung gehen ungebundene Aminosäuren in Lösung und die Bindung zwischen Aminosäuren und tRNS wird hydrolysiert. Die auf den Filtern verbleibende Radioaktivität befindet sich theoretisch ausschliesslich nur noch in Polypeptiden. Nach dem Trocknen werden die Scheibchen in Toluolszintillator (0,03 % POPOP, w/v; 0,55 % PPO, w/v) aufgenommen. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in den Geräten ISOCAP oder MARK II (Searle Nuclear Chicago). Als Kontrollwerte für die Adsorption von freien Aminosäuren an das Filter dienen die zum Zeitpunkt 0 Minuten abpipetierten Proben. Die zum Ende einer Inkubation entnommenen Proben aus Ansätzen ohne RNS bestimmen die endogene Proteinsynthese. Die mit diesen Kontrollwerten korrigierten Einbaudaten von Proben mit RNS ergeben dann die RNS-spezifische Proteinsynthese.

4.5 Präparation von Hefemitochondrien

Die Hefezellen werden in YPD- oder YPGal-Medium über Nacht bei starker Belüftung gezüchtet. Bei einem Zelltitert von $4 - 8 \times 10^7$ werden die Zellen 5 Min bei 3 500 rpm abzentrifugiert (Sorvall, GSA Rotor) und zweimal mit Wasser gewaschen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte entweder durch osmotische Lyse von enzymatisch protoplastierten Zellen nach der Methode von Schatz und Kováč (1974) oder durch mechanisches Zerschlagen mit Glasperlen nach der Methode von Matoon und Balcavage (1968). Die bei diesen Verfahren gewonnenen Zellsuspensionen werden durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationen (10 Min, 3 000 rpm und 10 Min, 4 000 rpm, Sorvall, SS 34 Rotor) von nicht homogenisierten

Zellen, Membranrückständen und Zellkernen befreit. Der Überstand wird 20 Min mit 18 000 rpm abzentrifugiert; das dabei gewonnene Pellet enthält Mitochondrien und Mitochondrienfragmente stark angereichert. Aus dem Überstand kann, wie in B. 4.6.2 beschrieben, cytoplasmatische RNS isoliert werden. Die angereicherten Mitochondrien werden durch eine Aufeinanderfolge von niedertourigen (3 000 rpm) und hohtourigen (18 000 rpm) Zentrifugationen weitergereinigt, je nach Verwendung in den entsprechenden Puffern gelöst und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C eingefroren. Zur Vermeidung von Proteolyse durch freigesetzte Proteasen ist allen Puffern 1 mM PMSF zugesetzt.

4.6. Extraktion der RNS

4.6.1 Isolierung mitochondrialer RNS

Die nach Abschnitt B. 4.5 gewonnenen Mitochondrien werden mehrmals mit Lysispuffer (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,02 % Bentonit, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) gewaschen und in einem kleinen Volumen des gleichen Puffers aufgenommen. Zur Lyse werden SDS, Sarkosyl, Diäthylpyrocarbonat und Bentonit dazugegeben, so dass die jeweiligen Endkonzentrationen 2 % (w/v), 1 % (v/v), 1 % (v/v) und 1 mg/ml betragen. Nach 15 Min wird das Lysat mit dem gleichen Volumen von puffergesättigtem Phenol/m-Kresol/8-Hydroxychinolin (100:14:0,1; v/v) 10 Min geschüttelt. Die weitere Extraktion der RNS erfolgt mit heissem Phenol (60°C) und Chloroform nach der Methode von Penman (1966). Durch Zugabe von 2,5 Volumen 96 % Äthanol und 0,1 Volumen 3 M Natriumazetat, pH 5,5 wird die RNS über Nacht bei -20°C aus der wässrigen Phase präzipitiert. Kontaminierende DNS wird durch Behandlung mit DNase nach der von Grivell et al. (1971) beschriebenen Methode entfernt.

4.6.2 Isolierung cytoplasmatischer RNS

Aus dem postmitochondrialen Überstand (siehe B. 4.5) werden die Nukleinsäuren mit 2,5 Volumen 96 % Äthanol über Nacht bei -20°C präzipitiert. Das getrocknete Präzipitat wird in 10 ml Puffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,4) aufgenommen und mit Phenol-Chloroform, wie in Abschnitt B. 4.6.1 beschrieben, extrahiert.

4.6.3 Gewinnung von M12 Phagen RNS

Gereinigte M12 Phagen wurden von Frau Dr. Leipold, MPI für Biochemie, Martinsried, zur Verfügung gestellt. 0,5 ml einer Phagensuspension mit einem Titer von 1×10^{15} werden in 2 ml STE-Puffer (0,1 M NaCl, 1mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8) verdünnt und auf 1 % SDS gebracht. Die weiteren Schritte der RNS-Extraktion, wie Phenolbehandlung und Äthanolpräzipitation, sind die gleichen wie unter B. 4.6.1 beschrieben.

4.7 Bestimmung der Reinheit und der Konzentration von RNS

Von den Lösungen wird das UV-Absorptionsspektrum zwischen 210 nm und 300 nm im Spektralphotometer (Gilford S 2400) aufgezeichnet und das OD-Verhältnis 260 nm/280 nm bestimmt. Kontaminationsfreie RNS weist einen Wert über 2,0 auf. RNS-Proben mit einem geringeren Wert wurden einer nochmaligen Phenolextraktionsbehandlung, wie in B. 4.6 beschrieben, unterzogen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht ein OD-Wert von 1 einem RNS-Gehalt von $40 \mu\text{g/ml}$ (Rubin G. M., 1975)

4.8 Elektrophorese von RNS

Die elektrophoretische Auftrennung von RNS erfolgt in Gegenwart von Formamid nach der Methode von Duisberg und Vogt (1973).

Zur Herstellung von 3,5 % (w/v) Polyacrylamidgelen werden 1,4 g Acrylamid und 0,244 g Bisacrylamid in 39,5 ml gepuffertem Formamid (20 mM Na-phosphat, pH 7) gerührt. $250 \mu\text{l}$ Ammoniumpersul-

fat (10 % w/v) und 40 μ l TEMED werden hinzugefügt, die Lösung in zylindrische Glasröhrchen (0,6 cm x 12 cm) gegossen und mit 50 μ l Wasser überschichtet. Die Endkonzentration von Formamid in diesen Gelen beträgt 96 - 98 %.

Formamid-denaturierte RNS-Proben werden hergestellt durch Zugabe von 25 μ l phosphatgepuffertem Formamid (2 mM Na-phosphat, pH 7) und 15 μ l einer Lösung aus 1 Volumen Formamid, 1 Volumen Glycerin und genügend Bromphenolblau als Frontindikator zu 10 - 30 μ g äthanolpräzipitierter RNS. Die RNS-Proben werden mit Pasteurpipetten unter eine 5 cm hohe Flüssigkeitssäule aus gepuffertem Formamid (20 mM Na-phosphat, pH 7) unterschichtet. Oberes und unteres Pufferreservoir enthalten 40 mM Na-phosphatpuffer, pH 7 in Wasser. Die Elektrophorese bei Raumtemperatur dauert in 3,5 %-Gelen bei einer Spannung von 100 V (entspricht 15 V/cm) etwa 12 Stunden. Nach dem Lauf werden die Gele in Wasser gewaschen und die RNS-Banden mit Methylenblau angefärbt.

4.9 Analyse in vitro synthetisierter Polypeptide

4.9.1 Gelelektrophoretische Auftrennung in vitro synthetisierter Polypeptide

Die in einem Standardproteinsyntheseansatz gebildeten Proteine werden nach Ablauf der Inkubationszeit in 25 μ l eines Stoppgemisches (12,5 % SDS, w/v; 20 % Glycerin, w/v; 20 mM DTT; 50 μ g/ml Bromphenolblau) gelöst und für 2 Min bei 100°C reduziert. Die Auftrennung der Proben erfolgt in 12,5 %-Polyacrylamidgelen nach der Methode von Laemmli (1970). Es werden zylindrische Gele (0,6 cm x 10 cm) mit einem 1 cm langen Sammelgel (5 % Acrylamid) routinemässig benutzt. Der Elektrophoresepuffer enthält 0,052 M Tris-Glycin, pH 8,8 und 0,1 % SDS. Die dissoziierten Polypeptide werden vorsichtig auf das Gel aufgetragen und mit 1 Milliampere/Gelröhrchen bei 4°C elektrophoretisiert, bis die Bromphenolblaufront ca. 0,5 cm vom unteren Ende des Gelröhrchens entfernt ist.

4.9.2 Analyse der elektrophoretisierten Polypeptide

Nach Beenden der elektrophoretischen Trennung werden die Gele für mindestens 30 Min in 10 % TCA, 20 % Methanol fixiert, für 2 Stunden mit 0,25 % Coomassie-Blau G-250 in 7,5 % Essigsäure, 50 % Methanol angefärbt und in 7,5 % Essigsäure entfärbt. Zum Bestimmen der Radioaktivität werden die Gele auf einem Gelschneider (Joyce-Loebl) mit flüssigem CO₂ festgefroren und sequentiell in 1 mm dicke Scheibchen zerlegt. Diese werden in Szintillationsgläschen überführt, 2 Stunden bei 60°C in 0,5 ml SDS-Puffer (1 % SDS, 0,1 M Tris-HCl, pH 8) geschüttelt und mit 15 ml Szintillator (Äthylenglykollmethylläther, 40 %, v/v; Butyl-PBD, 0,6 %, v/v; Toluol 59,4 %, v/v) versetzt. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte wie in B 4.4 beschrieben. Die Molekulargewichte der Polypeptide werden aus einer Eichkurve bestimmt, auf welcher der Logarithmus der Molekulargewichte von Standardproteinen gegen deren R_f-Wert (= Verhältnis der Laufstrecke eines Proteins zur Laufstrecke des Frontindikators) aufgetragen sind. Als Standardproteine wurden verwendet: BSA (MG 68 000), Ovalbumin (MG 44 000), Carbanhydrase (MG 29 000) und Cytochrom c (MG 12 700).

4.10 Immunologische Analyse *in vitro* synthetisierter Polypeptide

4.10.1 Immunpräzipitation

Die Gewinnung des Immunpräzipitats folgte der von Scragg et al. (1976) beschriebenen Methode. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird dem Proteinsyntheseansatz KCl und Triton X-100 zugefügt, so dass deren Endkonzentrationen 1M bzw. 1 % betragen. Nach dem Abzentrifugieren von ungelöstem Material (Eppendorf-Tischzentrifuge, 10 Min, 9 000 rpm) erhält der Überstand 10 µl Ovalbumin (10 mg/ml) und 50 µl Anti-Ovalbuminserum. Das entstehende Präzipitat, das hauptsächlich unspezifisch adsorbierende Proteine enthält, wird nach 2 Stunden abzentrifugiert, der Überstand erhält 200 µg unmarkiertes Trägerantigen (mitochondriale Membranen, 4 mg/ml). Nach 30 Min In-

kubation bei 37°C wird das Gemisch über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Die Immunpräzipitate werden pelletiert und 3 x mit PBS-Puffer (0,1 M NaCl, 50 mM Na-phosphat, pH 7) gewaschen. Anschliessend werden sie in 0,7 ml "Soluene"-Gewelöser, der 10 % Wasser (v/v) enthält, suspendiert, durch Inkubation bei 50°C gelöst und in einem Toluolszintillator, wie in B.4.4 beschrieben, ausgezählt. Die qualitative Analyse der immunpräzipitierten in vitro Produkte erfolgt in der SDS-Gelelektrophorese. Dazu werden die gewaschenen Immunpräzipitate in Dissoziationspuffer (1 % SDS, w/v; 10 mM DTT; 50 mM Tris-HCl, pH 6,8) gelöst und gemäss den beschriebenen Methoden (siehe B.4.9.1 bzw. B.4.9.2) weiterbehandelt.

Immunpräzipitate nach in vivo Markierung werden aus solubilisierten Mitochondrien (Endkonz.: 1 % Triton X-100, 1,2 M KCl) nach der Methode von Ebner et al. (1973) gewonnen.

4.10.2 Immundiffusion

Doppeldiffusionstests nach Ouchterlony (1967) werden auf Objektträger (76 mm x 26 mm) ausgeführt, die mit heisse Agaroselösung (1 %) in 0,9 % NaCl, 0,1 % Na-azid, 10 mM Tris-Sulfat, pH 7,4 beschichtet wurden. Nach dem Erstarren der Lösung werden in ausgestanzte Löcher (ϕ 2-3 mm) Antigen- bzw. Antikörperhaltige Lösungen einpipetiert (10 - 20 μ l). Am Ort maximaler Immunreaktion entwickeln sich innerhalb von 4 - 5 Tagen bei 4°C Präzipitationslinien, die entweder mit freiem Auge oder nach Anfärben mit Coomassieblaulösung (siehe (B.4.9.2) sichtbar sind. Eine Steigerung der Empfindlichkeit lässt sich erzielen, wenn die Agaroseplättchen nach Auswaschen der ungebundenen Proteine mit 50 μ l 125 Jod-markiertem Protein A (1 mg/ml, $1-5 \times 10^8$ cpm/mg) in 100 ml PBS-Puffer (0,1 M NaCl, 0,05 M Na-phosphat, pH 7,0) inkubiert werden. Dieses Protein bindet spezifisch an Antikörper und deren Immunkomplexe (Sjöquist et al. 1967). Nach Abwaschen der nicht gebundenen Radioaktivität werden die Agaroseplatten unter einem Haarfön getrocknet und autoradiographiert (siehe B.4.12)

4. 11 Radioaktive Markierung mitochondrialer Translations- produkte

4. 11. 1 Markierung mit ^3H -Leucin oder ^{35}S -Methionin

Hefezellen in YPD- oder YPGal-Medium werden bei einem Titer von $2 - 4 \times 10^7$ geerntet und zweimal mit Inkubationsmedium (YNB-Medium, 1 % Glycerin) gewaschen. Das Pellet wird erneut in Inkubationsmedium suspendiert, so dass der Zelltitel zwischen 1×10^8 und 5×10^8 beträgt, und 30 Min bei 30°C geschüttelt. 5 Min nach Zugabe von CHX (Endkonz. $200 \mu\text{g/ml}$) zum Blockieren der cytoplasmatischen Proteinsynthese (Schweyen, 1970) erhalten die Zellen ^3H -Leucin ($20\text{-}200 \mu\text{Ci}$ pro 1×10^8 Zellen) oder ^{35}S -Methionin ($200 \mu\text{Ci}$ pro 1×10^8 Zellen). Nach einer Stunde bei 30°C wird der Einbau der Radioaktivität durch Zugabe von unmarkiertem Leucin bzw. Methionin (Endkonz. 5 mM) gestoppt. Nach 30 Min Schütteln werden die Zellen abzentrifugiert und die Mitochondrien isoliert (siehe B. 4.5).

4. 11. 2 Markierung mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$

Die meisten cob^- Mutanten stammen von dem Wildtypstamm 777-3A, der die Kernmutation op 1 trägt (Kotylak und Slonimski, 1977). Da diese Mutation die korrekte Markierung von mitochondrialen Translationsprodukten stört (Claisse et al. 1978; Haid et al. 1979), werden die Stämme zunächst mit einem rho^0 -Stamm, der aus den Wildtypstämmen KL 14-4A oder RM 590-9D durch Behandlung mit Ethidium Bromid ($10 \mu\text{g/ml}$) gewonnen wurde, gekreuzt. Diese Stämme enthalten das dominante OP 1 Wildtyp-Allel; die nach der Kreuzung gebildeten Diploiden markieren dann normal.

Die diploiden Zellen werden bei 30°C in 2 ml YPGal-Medium bis zur frühen stationären Phase gezüchtet. Die Kulturen erhalten dann 3 ml frisches Medium und werden 2 - 3 Stunden weitergezüchtet. Die Zellen werden zweimal mit Wasser gewaschen und eine Stunde präinkubiert in LSM-Medium, dem als Kohlenstoffquelle 0,3 % Galaktose zugesetzt

ist. Zusätzlich enthält das Medium CAP (4 mg/ml), um den Einbau von Markierung in Apocytochrom b zu verstärken (Katan et al. 1976). Die Zellen werden 4 x in LSM-Medium, 0,3 % Galaktose gewaschen und in 2 ml LSM, 0,3 % Galaktose suspendiert (Zellkonzentration 1×10^8 /ml). Nach Supplementieren der Zellkultur mit CHX wird 5 Min später trägerfreies $^{35}\text{SO}_4^{--}$ (Endkonz. 200 $\mu\text{Ci/ml}$) zugefügt und die Inkubation für eine Stunde fortgesetzt. Die Suspension wird anschliessend mit 3 ml "Chase"-Medium (1 % Caseinhydrolysat, 2 mg/ml Na_2SO_4) verdünnt und weitere 10 Min geschüttelt. Nach dem Waschen mit "Chase"-Medium werden die Kulturen in 5 ml frisches "Chase"-Medium suspendiert und eine Stunde ins Eisbad gestellt. Diese Prozedur verstärkt zusätzlich den Einbau von Markierung in die mitochondrialen Translationsprodukte der Mutanten. Die gleichzeitige Gewinnung der Mitochondrien aus vielen parallelen Markierungsansätzen erfolgt nach der Methode von Needleman und Tzagoloff (1975).

4. 12 SDS-Elektrophorese in Polyacrylamid-Gradientengelen

Isolierte Mitochondrien werden in 2,5-fach konzentriertem Dissoziationspuffer und H_2O so verdünnt, dass in der Proteinprobe folgende Endkonzentrationen erreicht werden: Protein 1 mg/ml; SDS 5 % (w/v); DTT 0,25 % (w/v); Glycerin 10 % (v/v). Nach 2 Min Kochen werden die Proben in die Taschen des Sammelgels eines SDS-Plattengelsystems aufgetragen. Dieses enthält die gleichen Komponenten wie von Laemmli (1970) beschrieben. Die Trenngele weisen einen exponentiellen Gradienten der Acrylamidkonzentration von 10 % (oben) bis 15 % (unten) auf (Douglas und Butow, 1976). Die Gelapparaturen waren modifizierte Nachbauten der Institutswerkstatt des von Studier (1973) beschriebenen Platten(=Slab)gel-Modells. Die Auftrennung der Proteine erfolgte über Nacht bei einer angelegten Spannung von 70 V (= 3,5 V/cm Gel). Nach dem Lauf wurden die Gele mit ^3H -markierten Proben nach der Methode von Bonner und Laskey (1974) behandelt und fluorographiert. Die Exposition des

Filmes (Kodak Royal X-Omat XR-5) erfolgte bei -80°C . Gele mit ^{35}S -markierten Proteinen wurden sofort in einem Geltrockner (Hoefner Instruments, San Francisco) auf Filterpapier (Whatmann 1 oder 3MM) getrocknet und autoradiographiert (Kodak Regulix BR -5 Roentgenfilm).

Als Molekulargewichtsstandards werden die gleichen Proteine wie in B. 4.9 verwendet; sie waren durch Kopplung mit Fluorescamin nach der Methode von Udenfried et al. (1972) zusätzlich fluoreszenzmarkiert. Bei der Bestrahlung der Gele mit langwelligem UV-Licht erscheinen die aufgetrennten Standard-Proteine als gelblich leuchtende Banden.

4. 13 Eindimensionale Peptidkartierung

Markierte Wildtyp- und Mutantenmitochondrien werden auf 2mm Slabgelen aufgetragen, deren Sammelgel keine Taschen enthält. Nach der Elektrophorese werden die Gele kurz angefärbt und entfärbt (siehe B. 4.9.2). Ein Seitenstreifen des Gels wird getrocknet und autoradiographiert, um Wildtyp-Apocytochrom b oder ein neues Mutantenprotein in Relation zu den angefärbten Banden identifizieren zu können. Der Bereich mit den interessierenden Proteinen wird aus den Gelen ausgeschnitten, wobei die gefärbten Banden als Leitlinien dienen. Die ausgeschnittenen Gelstücke werden mit 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1 % SDS; 5 mM DTT aequilibriert und in die Taschen eines zweiten Slabgels transferiert. Protease wird in die Geltaschen zupipettiert und die nach der begrenzten Proteolyse erzeugten Peptide nach der Methode von Cleveland et al. (1977) elektrophoretisch getrennt. Die Gele werden nach der Beendigung des Laufes, wie in B. 4.12 beschrieben, autoradiographiert.

4. 14 Tieftemperaturspektroskopie

Mutantenkolonien werden auf YPGal-Platten unter nicht-permissiven Bedingungen bebrütet, nach 2 - 4 Tagen abgekratzt und auf Filter-

papier getrocknet. Die Zellpaste wird in eine Plexiglaszelle (Lichtweg 1mm) eingestrichen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die einzelnen Cytochrom-Absorptionsbanden werden dann mit einem Handspektrometer, wie von Shermann und Słonimski (1964) beschrieben, analysiert.

4. 15 Sonstige Methoden

Die Temperatursensitivität der cob^- -Mutanten wurde durch Bestimmen des Wachstums bei $18^{\circ}C$, $23^{\circ}C$, $30^{\circ}C$ und $36^{\circ}C$ geprüft. Als Test-Medium diente Glycerin-Medium.

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) gemessen. Als Schnelltest diente in einigen Fällen die von Bradford (1976) beschriebene Methode.

Die Bestimmung der freien elektrophoretischen Mobilität folgt der von Banker und Cotman (1972) beschriebenen Methode, mit der Ausnahme, dass Slabgele verwendet wurden.

Cytochrom c Oxidase aus Hefe wurde nach der Methode von Mason et al. (1973) isoliert.

Das Jodieren von Protein A erfolgte nach der Vorschrift von Thorell et al. (1971).

C. Ergebnisse

Teil 1 Translation mitochondrialer RNS in einem zellfreien E.coli-System

1. Aufbau eines RNS-abhängigen Translationssystems

Grundlage für die nachfolgend dargestellten Experimente war das nach Nirenberg und Matthaei (1961) modifizierte in vitro System von Konings et al. (1970). Dieses besitzt die Fähigkeit, neben viraler RNS auch mRNS aus Eukaryontenzellen zu translatieren (Siegert et al. 1972; Siegert et al. 1973; Gielkens et al. 1972). Es handelt sich dabei um ein präinkubiertes System; um in ihm die Ablesung der endogenen mRNS, bzw. deren Neusynthese so gering wie möglich zu halten, werden vor Beginn der in vitro Synthese DNS und Polysomen des S-30-Überstandes entfernt. Dies geschieht durch Zugabe von RNasefreier DNase während der Präparation des zellfreien Extrakts und durch Inkubation des isolierten Translationssystems mit ATP und GTP bei 37°C in Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems, bestehend aus Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvatkinase. Dieser letztgenannte Schritt fördert das Ablaufen der Ribosomen von den polysomalen Strukturen; eine Neuinitiierung ist ohne exogene Zugabe bestimmter Komponenten zum in vitro Ansatz nicht mehr möglich.

Der isolierte S-30-Extrakt sollte im Kontrollexperiment in der Lage sein, RNS aus dem E.coli Phagen M12, deren Funktion als mRNS bekannt ist (Konings et al. 1970), zu translatieren.

Die M12-RNS ($MG\ 1 \times 10^6$) kodiert lediglich für 3 Proteine: einem Hüllprotein ($MG\ ca.\ 14\ 000$), einem A-oder Reifungsprotein ($MG\ 37\ 000$) und einer speziellen Replikase ($MG\ ca.\ 56\ 000$). Ein für die Analyse dieser Proteine wichtiges Charakteristikum stellt das Fehlen der Aminosäure Histidin im Hüllprotein dar. Um den Translationsschritt des zellfreien E.coli-Extrakts zu testen, wurde RNS

aus M12 Phagen isoliert, davon jeweils 10 µg in einem Standard-Proteinsyntheseansatz zugesetzt und 30 Min bei 37°C inkubiert. Zur radioaktiven Markierung wurden in einem Ansatz 5 µl ^3H -Histidin (55 Ci/mmol, 2 nmol/ml) zugesetzt; ein zweiter Ansatz erhielt 5 µl ^3H -Leucin (60 Ci/mmol, 10 nmol/ml). Aus dem gleichen Extrakt wurden, zur Kontrolle des endogenen Einbaus, Ansätze ohne RNS inkubiert. Anschliessend wurden die in vitro Ansätze elektrophoretisiert und das Verteilungsmuster der Radioaktivität in den Gelen bestimmt.

Aus Abb. 2 geht hervor, dass in Gegenwart von ^3H -Leucin bevorzugt zwei Polypeptide markiert werden. Die elektrophoretischen Beweglichkeiten stimmen mit denen des Phagen-Hüllproteins und der Replicase überein. Bei Markierung mit ^3H -Histidin tritt die Bande des Hüllproteins mit dem Molekulargewicht 14 000 nicht mehr auf. Eine deutliche Bande mit einem Molekulargewicht von 37 000 (A-Protein) fehlt bei beiden Markierungsversuchen; dies war zu erwarten, da die Produktion dieses Proteins sowohl in vivo als in vitro durch das Hüllprotein unterdrückt wird (Levine B., 1977).

Aus dem Ergebnis dieses Versuches ist zu ersehen, dass die Translation der Phagen-RNS in dem erstellten in vitro System korrekt abläuft.

2. Versuch der in vitro Synthese mitochondrial codierter Polypeptide im zellfreien System

2. 1 Isolierung mitochondrialer RNS

Im vorangegangenen Abschnitt war gezeigt worden, dass der isolierte S-30-Extrakt unter der Steuerung der Phagen-RNS die Befähigung aufweist, den Einbau von Aminosäuren in diskrete Proteine zu stimulieren. Als nächstes galt es zu klären, ob diese Fähigkeit der in vitro Synthese auch in Abhängigkeit der mRNS aus Hefemitochondrien gegeben war.

Mitochondriale mRNA konnte in einigen eukaryotischen Systemen mit Hilfe der Affinitäts-Chromatographie oder durch Isolierung der gereinigten polysomalen Strukturen gewonnen werden (Brauerman G., 1974). Leider gelang es bisher aber nicht, mit diesen Methoden bei Hefe eine reine mitochondriale mRNA-Fraktion zu isolieren. Die Versuche, intakte reine Polysomen aus Mitochondrien als Quelle für mRNA zu gewinnen, scheiterten, weil es nicht möglich war, kontaminierende Nukleinsäuren des Zellsaftes in ausreichendem Masse zu entfernen (Moorman und Grivell, 1975). Da die mRNA aus Hefemitochondrien, anders als die mitochondriale RNA aus Säugetiermitochondrien, an ihrem 3'-Ende - wenn überhaupt - nur eine kurzketzige poly(A)-Struktur besitzt, war eine spezifische Anreicherung mit Mitteln der Affinitäts-Chromatographie über Oligo-(dT)-Cellulose oder poly(U)-Sephrose ebenfalls nicht möglich (Groot et al. 1974; Borst et al. 1977).

Aus diesen Gründen wurde in den folgenden in vitro Experimenten anstelle von reiner mRNA die gesamte mitochondriale RNA-Fraktion isoliert und deren mRNA-Aktivität im zellfreien System ermittelt.

In Abb. 3 sind die gelelektrophoretischen Profile der mitochondrialen und der cytoplasmatischen RNA des Wildtypstamms 777-3A dargestellt. Die in 3a) erkennbaren Hauptbanden repräsentieren die 21 S rRNA und die 15 S rRNA der mitochondrialen Ribosomen sowie die 4 S RNA (tRNA) der mitochondrialen Fraktion. Die beiden mitochondrialen rRNA-Species sind kleiner und sedimentieren bei Gradientenzentrifugationen langsamer als die in 3b) dargestellten cytoplasmatischen 25 S- und 18 S rRNA-Komponenten. In der Elektrophorese hingegen weisen sie selbst unter denaturierenden Bedingungen (Formamid, Harnstoff) eine geringere Mobilität auf (Stewart P.R., 1973). Diese Eigenschaft ist vermutlich auf den geringen G + C-Gehalt der mitochondrialen rRNA (25 - 33 % je nach Stamm) zurückzuführen (zum Vergleich: G + C-Gehalt der cytoplasmatischen rRNA 45 - 52 %).

Diskrete mitochondriale mRNS-Banden liessen sich nach gelelektrophoretischer Auftrennung nicht identifizieren. Die Frage, ob dies auf den geringen Anteil der mRNS an der gesamten mitochondrialen RNS zurückzuführen ist, oder ob mRNS durch Methylenblau schlechter anfärbbar ist als die übrigen RNS-Komponenten, konnte mit den zum Zeitpunkt der Versuche zur Verfügung stehenden Methoden nicht beantwortet werden.

2. 2 Optimierung der mtRNS-abhängigen *in vitro* Proteinsynthese

Die Bestimmung der optimalen Synthesebedingungen in Gegenwart von mtRNS erfolgte in Standard-Syntheseansätzen wie in Material und Methoden beschrieben. Als Mass für die Proteinsynthese wurde der Einbau von ^{35}S -Methionin in Produkte bestimmt, die in heisser TCA beständig waren und sich mit TCA auf Filter präzipitieren liessen. Pro Ansatz wurden 10 μl mtRNS und 5 μl ^{35}S -Methionin zugegeben. Die bei den jeweiligen Versuchen verwendeten Konzentrationen und spezifische Aktivitäten sind aus den Abbildungen und den Tabellen ersichtlich. Um einen proteolytischen Abbau während der Inkubation zu verringern, enthielt das System PMSF (Endkonz. 1 mM). In den folgenden Versuchen wurden die Abhängigkeit der *in vitro* Proteinsynthese vom Ionenmilieu, von der Menge eingesetzter mtRNS und der Inkubationszeit bestimmt und die Bedingungen für eine optimale Stimulierung ermittelt.

In Abb. 4a) ist die Abhängigkeit der Syntheseaktivität von der Magnesiumionen-Konzentration dargestellt. Das Maximum der Aktivität liegt bei 11 - 12 mM Mg^{++} , was für eine spezifische Initiation von mtRNA bei der Translation spricht. Das Optimum des (unspezifisch initiiierenden) poly(U)-abhängigen Phenylalanineinbaus beträgt in allen *E. coli in vitro* Systemen zwischen 16 und 20 mM Mg^{++} . Alle weiteren Versuche wurden mit einer Mg^{++} -Ionenkonzentration von 9 - 11 mM durchgeführt, um eventuell doch auftretende unspezifische Initiationsvorgänge zu unterdrücken.

Bei einer Mg^{++} -Ionenkonzentration von 10 mM durchläuft, wie aus Abb. 4b) hervorgeht, die in Abhängigkeit der Ammoniumionen-Konzentration gemessene Syntheseaktivität eine Optimumskurve mit einem Gipfel zwischen 60 und 70 mM NH_4^+ .

Die Zugabe von steigenden Mengen mtRNS führte bis zu einer Konzentration von 200 $\mu g/ml$ (= 13 μg RNS pro Standardansatz) zu einem linearen Anstieg des ^{35}S -Methionineinbaus, eine Zugabe von größeren Mengen ergab keine weitere Steigerung der Proteinsyntheseaktivität (siehe Abb. 4c).

Abb. 4d) zeigt, dass bei optimierten Bedingungen (10 mM Mg^{++} , 70 mM NH_4^+ und 0,2 mg/ml mtRNS) die in vitro Proteinsynthese mit zunehmender Inkubationszeit für 40 Minuten linear ansteigt und mit ca. 7,5facher Stimulierung ein Plateau erreicht.

Weitere Eigenschaften des optimierten in vitro Systems sind in Tabelle II dargestellt. So stimuliert M12-RNS (0,15 mg/ml) den Einbau in phagenspezifisches Protein um den Faktor 23. Die Stimulation in Abhängigkeit von mtRNS (0,2 mg/ml) ist mit einem Faktor von 7,5 noch überraschend hoch, wenn man den geringen Anteil der mRNS an der mitochondrialen Gesamt-RNS berücksichtigt (ca. 5 - 10%). Das Fehlen von exogener E. coli tRNS im Standard-Syntheseansatz verringert die Syntheseaktivität nur geringfügig um etwa 12%. Wesentlich stärker wirkt sich das Fehlen von Leucovorin (5-Formyl-tetrahydrofolsäure) aus; bei Abwesenheit dieses Formylgruppendonors sinkt der Einbau auf etwa 30% der Aktivität des kompletten Systems. Offensichtlich enthält der zellfreie Extrakt nicht genügend Komponenten, um während der Dauer einer Inkubation das für die Initiierung notwendige Methionin zu formylieren.

2. 3 SDS-Gelelektrophorese in vitro synthetisierter Produkte

Wie gezeigt wurde, kann mtRNS in einem zellfreien E. coli System translatiert werden. Um die dabei gebildeten Polypeptide zu charakterisieren, wurden sie mit den authentischen (in vivo synthetisierten)

Produkten der mitochondrialen Proteinsynthese verglichen. Nach Pulsmarkierung an ganzen Hefezellen bei gleichzeitiger Hemmung der cytoplasmatischen Proteinsynthese mit CHX wird die Radioaktivität ausschliesslich in mitochondriale Translationsprodukte inkorporiert (Schatz und Mason, 1974). Das Markierungsmuster nach Isolierung und gelelektrophoretischer Auftrennung der markierten Mitochondrien ist in Abb. 5a) dargestellt. Die Hauptmenge der Radioaktivität findet sich in vier Banden wieder, die den Untereinheiten I (MG 40 000), II (MG 32 000) und III (MG 22 000) der Cytochrom c Oxidase sowie dem Apocytochrom b (MG 30 000) der QH₂-Cytochrom c Reduktase zugeordnet werden können (Mason et al. 1973; Tzagoloff et al. 1973; Katan et al. 1976). Im Vergleich dazu ist in Abb. 5b) ein charakteristisches Gelprofil in vitro gebildeter Proteine dargestellt. Wie daraus zu ersehen ist, synthetisiert das zellfreie System in Abhängigkeit von mtRNS fast ausschliesslich kurze Polypeptide mit einem Molekulargewicht unter 29 000. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um heterogenes Material, da selbst nach einer Serie von unabhängigen Versuchen keine reproduzierbaren diskreten Banden entdeckt werden konnten. In keinem einzigen Falle stimmte die elektrophoretische Beweglichkeit eines der in vivo gebildeten Polypeptide mit der eines in vitro Produkts überein. Zu einem gleichen Ergebnis kamen nach Abschluss der vorstehend geschilderten Arbeiten Moorman et al. (1977, 1978b).

Die Autoren konnten zeigen, dass das heterogene Verteilungsmuster der in vitro Produkte durch die Wechselwirkung der neu synthetisierten mitochondrialen Polypeptide mit den Proteinen des zellfreien Extraktes hervorgerufen wird. Infolge ihrer starken hydrophoben Eigenschaften weisen die kurzen in vitro synthetisierten Polypeptide eine sehr starke Neigung zur Aggregation mit anderen E. coli- oder mitochondrialen Proteinen auf, die selbst in Gegenwart von Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid nur reduziert, nicht aber vollständig unterdrückt werden kann.

Der direkte Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeiten bot bei diesem Sachverhalt keine Möglichkeit, in vitro synthetisiertes Apocytochrom b zu identifizieren. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Experimenten versucht, die in vitro Synthese dieses Polypeptids serologisch nachzuweisen.

3. Immunologische Analyse in vitro synthetisierter Mitochondrienpolypeptide

3. 1 Nachweis der Spezifität von Antiseren im Immundiffusionstest

Zum Zeitpunkt der Versuche stand kein monospezifisches Antiserum gegen Apocytochrom b zur Verfügung. Es wurde deshalb in den folgenden Versuchen ein Antiserum gegen mitochondriale Membranproteine eingesetzt. Untersuchungen von Scragg und Thomas (1975) deuteten darauf hin, dass dieses Serum auch Anikörper enthält, die gegen mitochondrial synthetisierte Proteine gerichtet sind. Die Spezifität dieses Serums wurde vor seinem Einsatz in Präzipitationsexperimenten in einem modifizierten Ouchterlony-Immundiffusionstest (siehe B. 4.10.2) überprüft und mit den Präzipitationseigenschaften anderer Seren gegen mitochondriale Proteine verglichen. Abb. 6 zeigt das Autoradiogramm eines solchen Versuchs. In Abb. 6a) ist die Reaktion der verschiedenen Antiseren gegen solubilisierete Mitochondrienproteine dargestellt. Das Antimembranserum gab, wie zu erwarten, eine Reaktion gegen solubilisierete Mitochondrien. Aus Abb. 6b) geht hervor, dass keines der Seren gegen mitochondriale Proteine eine Immunreaktion mit den Proteinen des zellfreien Extraktes hervorrief. Eine positive Immunantwort war nur beim Anti-S-30-Serum zu beobachten.

Das Serum gegen mitochondriale Membranen schien aufgrund dieser Ergebnisse geeignet, aus den in vitro Systemen mtRNS-abhängig synthetisiertes Protein zu präzipitieren; eine unspezifische Immunfällung von E.coli-Proteinen war nach den in Abb. 6b) dargestellten Befunden nicht zu erwarten.

3. 2 Immunpräzipitation von Polypeptiden nach mtRNS-abhängiger Proteinsynthese

In Tabelle III ist das Ergebnis einer solchen Immunpräzipitation dargestellt. Die Bedingungen des Standard-Syntheseansatzes wurden beibehalten, das Volumen des Inkubationsansatzes jedoch auf 0,5 ml erhöht, um nachweisbare Mengen präzipitierbaren Materials zu erhalten. Der mit dem Serum gefällte Anteil der in vitro synthetisierten Polypeptide betrug nach Abzug der Kontrollwerte für Antimembranserum 0,7 % und für ein zu Vergleichszwecken benutztes Anti-Cytochrom c Oxidase-Serum 1,4 %. In Konkurrenzexperimenten mit zugesetzter unmarkierter Cytochrom c Oxidase reduziert sich dieser Anteil bei beiden Seren auf etwa den Wert des Kontrollserums. Obwohl der Anteil präzipitierbaren Materials gering ist, lässt das Versuchsergebnis zwei Schlussfolgerungen zu:

- 1.) Das erhaltene Immunpräzipitat entsteht durch spezifische Fällung in vitro synthetisierter Polypeptide.
- 2.) Das Antimembranserum fällt aus dem in vitro Ansatz hauptsächlich - wenn nicht ausschliesslich - Polypeptide, welche gleiche antigene Determinanten wie die Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase tragen.

Die Fähigkeit des Serums, mit diesem Enzym zu reagieren, ist auch aus Abb. 7 zu ersehen. Es zeigt das Ergebnis eines Ouchterlony-Immundiffusionstests, bei dem als Antigen isolierte Cytochrom c Oxidase eingesetzt wurde.

3. 3 Gelelektrophoretische Analyse immunpräzipitierter Mitochondrienpolypeptide

Unbeantwortet blieb bisher die Frage, ob das Antimembranserum noch Antikörper enthält, die Apocytochrom b zu präzipitieren vermögen. Konkurrenzexperimente mit gereinigtem Cytochrom b - analog zu jenen, die im vorangegangenen Abschnitt beschrieben wurden - liessen sich nicht durchführen, da zum Zeitpunkt der Experi-

mente eine Reindarstellung dieses Proteins noch nicht möglich war. Es wurde deshalb versucht, durch gelelektrophoretische Trennung der immunpräzipitierten Proteine Apocytochrom b zu identifizieren. In Abb. 8 sind die Markierungsmuster jener Proteine gegenübergestellt, die mit Anti-Mitochondrienmembran-serum aus isolierten Mitochondrien (Abb. 8a) bzw. aus in vitro Syntheseansätzen (Abb. 8b) gefällt werden konnten. Die isolierten Mitochondrien stammten aus Zellen des Wildtyps 777-3A, die in Gegenwart von CHX markiert wurden. Nach Lyse der mitochondrialen Membranen mit KCl und Triton X-100 wurde der lösliche Proteinanteil mit Serum gefällt, gewaschen und in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Es lassen sich drei Hauptbanden mit einem Molekulargewicht von 40 000, 32 000 und 22 000 erkennen. Im Vergleich zum Verteilungsmuster mitochondrialer Translationsprodukte nach in vivo Markierung (Abb. 5a) fällt das Fehlen des Doppelgipfels (Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase und Apocytochrom b) bei ca 30 000 - 32 000 Dalton auf. Das Muster des Immunpräzipitats gleicht dem, das auch bei Fällung von solubilisierten Mitochondrienproteinen mit Anti-Cytochrom c Oxidase-Serum erhalten wurde (Ebner et al. 1973; Tzagoloff et al. 1973). Folgende Gründe sprechen dafür, dass die Einzelbande mit MG 32 000 die Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase und nicht das Apocytochrom b repräsentiert:

Das Solubilisieren mitochondrialer Membranen mit dem nicht-ionischen Detergens Triton X-100 lässt die mitochondrialen Membrankomplexe intakt (Ebner et al. 1973; Riccio et al. 1977). Seren gegen die Holo-Cytochrom c Oxidase oder deren Untereinheiten fällen deshalb immer das ganze Enzym. Deshalb können nach spezifischer Markierung in Gegenwart von CHX immer die drei mitochondrial synthetisierten Untereinheiten des Enzyms identifiziert werden.

Ein Verlust von Untereinheit II während der Immunfällung lässt sich zwar nicht ausschliessen, erscheint aber nicht zuletzt des-

halb als sehr unwahrscheinlich, als diese Untereinheit die mit am stärksten antigen wirkende Komponente des Enzymkomplexes ist. Alle bisher geprüften Seren gegen Holo-Cytochrom c Oxidase weisen deshalb einen sehr hohen Anteil Untereinheit II-präzipitierender Antikörper auf (Schatz G., persönliche Mitteilung). Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass Cytochrom b nur schwach antigen wirkt (Solioz M. und Haid A., unveröffentlicht; Grivell L., persönliche Mitteilung).

In Abb. 8b) ist das Gelprofil dargestellt, welches nach Immunpräzipitation in vitro synthetisierter mitochondrialer Proteine mit Antiserum gegen Mitochondrienmembranen erhalten wurde. Das Ergebnis bestätigt die in Absatz C. 2.3 erhaltenen Befunde, wonach im in vitro System in Abhängigkeit von mtRNS nur kurzkettige Polypeptide synthetisiert werden. Diese Produkte mit einem Molekulargewicht unter 15 000 sind, unter Berücksichtigung der Spezifität des Antimembranserums für Cytochrom c Oxidase, wahrscheinlich unvollständig synthetisierte Polypeptide der mitochondrial gebildeten Komponenten dieses Enzyms.

Obwohl ihr mtRNS- bzw. mtDNS-abhängiges in vitro System ebenfalls nur kurzkettige Produkte synthetisierte, konnten Moorman et al. (1978a, 1978b) mit Hilfe spezifischer Antiseren gegen die mitochondrial synthetisierten Untereinheiten von Cytochrom c Oxidase zeigen, dass der Ort ihrer Codierung die Mitochondrien-DNS ist.

In der Diskussion wird auf mögliche Ursachen, die das Auftreten der kurzen Polypeptide bewirken könnten, näher eingegangen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die, in den vorstehend beschriebenen Versuchen benutzten E. coli Extrakte nicht die Befähigung besitzen, vollständige mitochondriale Polypeptide zu synthetisieren. Diese Tatsache sowie das Fehlen eines geeigneten monospezifischen Antiserums verhinderten in den dargestellten Experimenten den Nachweis einer in vitro Synthese des Apocytochroms b.

Die Methodik der in vitro Synthese von Proteinen erwies sich unter diesen Bedingungen als ungeeignet, einen Beitrag zur Aufklärung des Codierungsgehaltes der COB-Region zu liefern.

Teil 2 Biochemische Analyse mitochondrialer Mutanten der COB-Region

Die unerwarteten Eigenschaften des zellfreien Systems, mitochondriale Polypeptide nur unvollständig zu synthetisieren, machte es erforderlich, andere, effektivere biochemische Techniken zur Analyse der Gen-Produkt-Beziehung zwischen der COB-Region der mtDNS und dem Apocytochrom b einzusetzen. Da das mitochondriale Proteinsynthesystem der mit⁻-Mutanten funktioniert, können deren mitochondriale Translationsprodukte auch nach in vivo Synthese analysiert werden. In Gegenwart von CHX, eines Hemmstoffs der cytoplasmatischen Proteinsynthese, erfolgt der Einbau radioaktiver Aminosäuren, bzw. ihrer Vorstufen nur in mitochondrial synthetisierte Proteine. Diese können nach Isolierung der Mitochondrien und ihrer elektrophoretischen Auftrennung identifiziert werden.

Wie bereits erwähnt, wird Apocytochrom b (MG 30 000) an mitochondrialen Ribosomen synthetisiert. Die von verschiedenen Arbeitsgruppen bisher durchgeführten gelelektrophoretischen Analysen von cob⁻-Mutanten ergaben, dass mit wenigen Ausnahmen ein mitochondriales Translationsprodukt mit dem apparenten Molekulargewicht von 30 000 als Folge der Mutation fehlt oder verändert ist. Obwohl noch direkte Beweise fehlen (z. B. durch vergleichende Aminosäuresequenzanalyse), herrscht auf Grund dieser Ergebnisse Übereinstimmung, dieses Translationsprodukt als das Apocytochrom b anzusehen (Tzagoloff et al. 1976; Mahler et al. 1977; Claisse et al. 1977).

Diskrepanzen ergaben sich allerdings bei den, von experimentellen Daten abgeleiteten Aussagen über den Codierungsgehalt der COB-Region. Tzagoloff et al. (1976) kartierten die Mutationsorte von 14 cob⁻-Mutanten in zwei getrennte Loci: COB 1 und COB 2 (siehe Abb. 1). Die phänotypische Analyse der Mutanten führte zu dem Schluss, das Strukturgen für Apocytochrom b in COB 2 zu lo-

kalisieren und COB 1 als Gen mit regulatorischer Funktion anzusehen. Untersuchungen an 3 cob^- -Mutanten veranlassten Mahler et al. (1977), ebenfalls COB 2 als codierenden Bereich anzunehmen. Kotylak und Slonimski (1976) beschrieben mit $^-$ -Mutationen, die zum gleichzeitigen Verlust der Cytochrome $\underline{b}$ und $\underline{aa}_3$ führten. Ihre Mutationsorte lagen in einem gemeinsamen, als BOX-Region bezeichneten Segment der mtDNS zwischen den Loci COB 1 und OLI 2. Weiterführende genetische und biochemische Studien an neu isolierten Mutanten zwangen dazu, die BOX-Region zu erweitern und in zunächst vier (Pajot et al. 1976), später in sechs (Kotylak und Slonimski, 1977) genetisch unterscheidbare Loci zu unterteilen, die im Zusammenhang mit der Biosynthese von Apocytochrom $\underline{b}$ standen. Nach gelelektrophoretischer Analyse der Translationsprodukte von 22 box^- -Mutanten schlossen Claisse et al. (1977) auf "die Existenz von mindestens drei Strukturgenen für Hefecytochrom $\underline{b}$ ", wobei es offenblieb, ob strukturell verschiedene Formen des Apocytochroms $\underline{b}$ oder drei identische Polypeptide codiert werden. Zwischen den einzelnen Strukturgenen postulierten die Autoren Bereiche mit regulatorischer Funktion. Ebenfalls drei Strukturgene für Cytochrom $\underline{b}$ schlugen Colson und Slonimski (1977) nach genetischer Analyse mitochondrialer Mutationen vor, die zur Resistenz gegen Inhibitoren der QH_2 -Cytochrom $\underline{c}$ Reduktase führen und die im gleichen DNS-Abschnitt kartieren wie cob^- - bzw. box^- -Mutationen.

Ungeklärt blieb bisher auch, ob nur eine oder mehrere, in ihrer Primärsequenz verschiedene Formen des Apocytochroms $\underline{b}$ existieren. Weiss und Ziganke (1974) berichten, nach Extraktion des bc_1 -Komplexes von *Neurospora crassa* zwei geringfügig in der Aminosäurezusammensetzung verschiedene Species des Polypeptids identifizieren zu können. Auf unterschiedliche Formen des Apocytochroms $\underline{b}$ deutet auch das Auffinden zweier spektral unterscheidbarer Cytochrom $\underline{b}$ -Komponenten (Cytochrom $\underline{b}_T$ = cyt $\underline{b}_{566}$ und Cytochrom $\underline{b}_K$ = cyt $\underline{b}_{562}$) in Hefemitochondrien hin. Ob diese bioche-

misch differenzierbaren Komponenten von einem oder von mehreren Gen(en) codiert werden, konnten die bisherigen Untersuchungen nicht klären.

4. Die genetische Karte der COB-Region

Die bisher über den Codierungsgehalt der COB-Region getroffenen widersprüchlichen Aussagen beruhten auf den genetischen und biochemischen Analysen einer kleinen Serie mitochondrialer Mutationen. Der Ansatz für vorliegende Untersuchungen war deshalb, eine weit grössere Zahl von cob^- -Mutanten nach durchgeführter Feinkartierung biochemisch zu analysieren.

Die Bestimmung der Reihenfolge ihrer Mutationsorte und ihrer Abstände zueinander erfolgte zunächst durch rho^- -Deletionskartierung (Schweyen et al. 1977). Diese erlaubte, die Mutationsorte in acht Gruppen zu ordnen und deren Reihenfolge in COB zu definieren. Um ihre Reihenfolge innerhalb dieser Gruppen festzulegen, wurden cob^- -Mutanten paarweise gekreuzt und der Prozentanteil atmender Rekombinanten (wachsen auf Glycerin) unter den diploiden Nachkommen bestimmt. Die maximale Rekombinationshäufigkeit atmender Rekombinanten beträgt ca. 12 % (die maximale Häufigkeit beider Rekombinantentypen liegt bei 25 %). Das Erreichen eines solchen Wertes in einer Kreuzung dient als Hinweis, die getesteten Mutationsorte als formal ungekoppelt zu betrachten. Die Rekombinationsanalyse aller cob^- -Mutanten führte zur Identifizierung dreier Kopplungsgruppen (Bechmann-Holzner, unveröffentlicht). In Abb. 21a) ist die genetische Karte der COB-Region dargestellt. Die Abstände der Mutationsorte sind proportional zur bestimmten Rekombinationshäufigkeit aufgetragen. Die gestrichelten Linien trennen die drei Kopplungsgruppen voneinander.

5. SDS-Gelelektrophorese mitochondrialer Translationsprodukte

Im Verlauf ihrer Studien am mitochondrial synthetisierten Var 1-Protein entwickelten Douglas und Butow (1976) eine SDS-Gradientengel-Elektrophorese, die sehr hohe Trennschärfen im Bandenmuster mitochondrialer Translationsprodukte lieferte. Im folgenden Experiment wurden mit dieser Methode die mitochondrial synthetisierten Produkte der cob^- -Mutanten fraktioniert und das resultierende Polypeptidmuster daraufhin untersucht, ob die Apocytochrom b-Bande noch ausgebildet wird.

Da die bisher üblichen Markierungsverfahren mit markierten Aminosäuren zu einem sehr niedrigen Einbau der Radioaktivität in Apocytochrom b führten, wurde eine bessere Markierungstechnik erarbeitet (vergl. B 4.11.2).

Unter diesen Versuchsbedingungen wird der radioaktive Einbau in mitochondriales Protein je nach Mutantenstamm um das 40 - 100-fache im Vergleich zu den früheren Verfahren stimuliert; unter optimalen Bedingungen wurde eine spezifische Aktivität von $1 - 2 \times 10^8$ cpm/mg Mitochondrienprotein erreicht.

In Abb. 9 ist auf der linken Seite das Bandenmuster der mitochondrialen Translationsprodukte des Wildtyps 777-3 A dargestellt. Es sind vier Hauptbanden klar zu erkennen, die nach absteigendem Molekulargewicht folgenden Polypeptiden zugeordnet werden: I (breite Bande): Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase; II: Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase; b: Apocytochrom b; III: Untereinheit III der Cytochrom c Oxidase.

Von 35 untersuchten cob^- -Mutanten fehlte bei 33 Mutanten das Polypeptid mit 30 000 Dalton, welches dem Apocytochrom b entspricht. Dieser Befund bestätigte insoweit Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Tzagoloff et al. 1976; Mahler et al. 1977; Claisse et al. 1977).

An Hand des Bandenmusters lassen sich die Mutanten in vier Klassen

einordnen (Vertreter dieser Klassen sind in Abb. 9 dargestellt):

Klasse 1: Die Mutanten (insgesamt 2) besitzen eine vom Wildtyp nicht zu unterscheidende Apocytochrom b -Bande (z. B. M4721).

Klasse 2: Den Mutanten (insgesamt 6) fehlt die Apocytochrom b -Bande. Es treten keine zusätzlichen Banden auf (z. B. M1231)

Klasse 3: Die den Mutanten (insgesamt 17) fehlende Apocytochrom-b -Bande ist ersetzt durch eine einzige Bande mit niedrigerem (16 Mutanten) oder höherem (1 Mutante) Molekulargewicht (z. B. M1322, M1354, G2494). Bei der Mutante G2494 fällt diese Bande in 10 - 15 %igen Gradientengelen mit der Bande der Untereinheit III der Cytochrom c Oxidase zusammen. In Gelen höherer Acrylamidkonzentration lässt sie sich davon abtrennen (Abb. 11).

Klasse 4: Den Mutanten (insgesamt 10) fehlt neben Apocytochrom b zusätzlich oft (8 Mutanten) die Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase; bei zwei Mutanten ist die Menge dieses Proteins reduziert; gleichzeitig weisen acht Mutanten zusätzliche Banden meist in Mehrzahl auf. Mindestens eine dieser Banden besitzt dann jeweils ein höheres Molekulargewicht als Apocytochrom b (z. B. M4111).

6. Analyse weiterer phänotypischer Eigenschaften der cob^- -Mutanten

Parallel zu den Untersuchungen der Translationsprodukte wurden die cob^- - Mutanten durch Analyse der spektralen Absorptionsbanden der Cytochrome b und aa₃ und durch Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Expression des Mutantenphänotyps weiter charakterisiert.

Die mitochondrialen Cytochrome der Wildtyp-Hefezellen weisen im

Spektrometer charakteristische Absorptionslinien auf. Diese liegen bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs für die Cytochrome c, c₁, b und aa₃ bei 547 nm, 553 nm, 558,5 nm und 602 nm.

cob⁻ - Mutanten sind, da sie kein funktionsfähiges Cytochrom b besitzen, atmungsdefekt. Fast allen Mutanten fehlt deshalb die Cytochrom b -Absorptionslinie bei 558,5 nm. Zwei Mutanten besitzen allerdings noch ein Cytochrom b -Spektrum. Es sind jene, die auch im SDS-Gel eine Apocytochrom b -Bande aufweisen (Klasse 1: M4721, M4410). Die Cytochrom b -Spektrallinie der Mutante M4721 ist um 1,5 nm zum längerwelligen Bereich hin verschoben (Bechmann-Holzner, unveröffentlicht).

Zusätzlich zum Cytochrom b fehlt der vierten im vorigen Abschnitt beschriebenen Mutantenklasse das Cytochrom aa₃; sie gleichen insoweit den Mutanten, die von Pajot et al. (1976) beschrieben und als "box⁻" bezeichnet wurden.

Acht Mutanten erwiesen sich als temperatursensibel, d.h. sie können bei 28°C auf nicht-vergärbaren Substraten wachsen, nicht hingegen bei 18°C (2 Mutanten), 36°C (3 Mutanten) oder weder bei 18°C noch bei 36°C (3 Mutanten). Mit einer Ausnahme zeigen alle temperatursensiblen Mutanten den zuvor erwähnten "box⁻"-Phänotyp.

7. Abhängigkeit des Phänotyps der cob⁻ - Mutanten von ihrem Mutationsort

In den beiden vorangegangenen Abschnitten wurden die Mutanten aufgrund ihrer phänotypischen Merkmale in Klassen eingeteilt. Dabei war bereits zu erkennen, dass die mutativen Veränderungen die Synthese des Apocytochroms b und damit die Bildung eines funktionsfähigen Cytochroms b beeinflussen. Die Lage des jeweiligen Mutationsorts der Mutanten in der COB-Region blieb bei dieser Betrachtung unberücksichtigt. In Tabelle IV sind die Mutanten entsprechend dieser Lage zwischen den flankierenden

Resistenzloci OLI 1 und OLI 2 aufgeführt (Richtung der Anordnung: OLI 2 $\rightarrow$ COB $\rightarrow$ OLI 1). Bei dieser Art der Darstellung lassen sich die Mutationsorte in fünf klar abgegrenzte Gruppen (A - E) zusammenfassen. Mutationen der Gruppe A kartieren am OLI 2-nahen Ende, jene der Gruppe E am OLI 1-nahen Ende der COB-Region (siehe Abb. 21a).

Die in Abschnitt C. 5 beschriebenen Klassen 1, 2 und 3 fallen in die Gruppen A, C und E; die Mutanten der Klasse 4 verteilen sich auf die Gruppen B und C.

Allen Mutanten der Gruppen A, C und E fehlt als einzige Polypeptidbande die des Molekulargewichts 30 000. Korreliert dazu verschwindet ebenfalls nur die spektrale Bande des Cytochroms b. Mit einer einzigen Ausnahme sind die Mutanten nicht-konditionell. Bei 16 Mutanten (von 25) ist das fehlende Apocytochrom b durch eine Polypeptidbande mit niederem Molekulargewicht, bei einer Mutante durch eine Bande mit höherem Molekulargewicht ersetzt. Die neu auftretenden Banden (im folgenden als "neue" Banden bezeichnet) haben ein unterschiedliches Molekulargewicht; dieses lässt sich mit der Lage der Mutationsorte der Mutanten korrelieren. Es steigt, wie aus Abb. 10 zu ersehen ist, in der Reihenfolge A (MG 13 000 - 15 000) $\rightarrow$ C (MG 15 000 - 20 000) $\rightarrow$ E (MG 22 000 - 30 500) an. Gleichzeitig nimmt es auch innerhalb der einzelnen Gruppen gemäss der Reihenfolge der Kartierungsorte in Richtung von OLI 2 $\rightarrow$ OLI 1 zu (siehe Abb. 11). Diese Zunahme folgt damit der gleichen Gesetzmässigkeit wie diejenige in der Gruppenreihenfolge A $\rightarrow$ C $\rightarrow$ E.

Der Mutationort aller Mutanten der Klasse 2 (Apocytochrom b -Bande fehlt, keine "neue" Bande tritt auf) liegt in einem Sektor des Abschnitts A, der dem Genort OLI 2 unmittelbar benachbart ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Mutanten ein kleineres Polypeptid als MG 13 000 synthetisieren, welches entweder vorzeitig abgebaut oder bei der benutzten Präparations- und Elektrophoresetechnik nicht mehr entdeckt werden kann.

In Abb. 21 c) sind die Molekulargewichte der "neuen" Polypeptidbanden der übrigen 17 Mutanten aus A, C und E gegen die genetische Karte aufgetragen. Aus dieser Darstellung ist zu ersehen, dass in diesen Gruppen eine colineare Beziehung zwischen der Grösse der Polypeptide und der Position ihrer entsprechenden Mutationsorte besteht. In dieses Schema der Colinearität lassen sich alle Mutanten mit "neuen" Banden ausnahmslos einordnen. So kartiert z. B. die Mutation M4494 (Abb. 12), die zum Auftreten einer "neuen" Bande mit MG 30 500 führt, auch als letzte am OLI 1-benachbarten Ende der COB-Region. Die Mutante G2494 liess - bei Annahme einer colinearen Beziehung - nach der Lage ihres Mutationsortes in der COB-Region eine Bande im Molekulargewichtsbereich zwischen 18 000 und 23 000 erwarten. Diese Bande konnte zunächst nicht entdeckt werden; phänotypisch wurde diese Mutante deshalb in die Klasse 2 (siehe Abschnitt C. 5) eingestuft. Spätere Versuche mit höherprozentigen Gelen führten dann zum Auffinden des "neuen" Polypeptids (Abb. 12). Sein Molekulargewicht liegt mit 22 000 im vermuteten Molekulargewichtsbereich; unter Standard-Versuchsbedingungen coelektrophoretisiert dieses Produkt mit der Untereinheit III der Cytochrom c Oxidase.

Die beobachtete Colinearität in A, C und E ermöglicht folgende Aussagen zu treffen:

- 1.) Die "neuen" Polypeptidbanden sind Fragmente (Homologe) des Apocytochroms b; ihre Entstehung ist auf Kettenabbruch-erzeugende Mutationen zurückzuführen.
- 2.) Die Mutationen, die zum Entstehen der Fragmente führen, markieren Strukturgenanteile des Apocytochrom b -Gens.
- 3.) Die COB-Region codiert ein einziges Polypeptid; das Apocytochrom b

Mutanten mit Mutationsorten in den Gruppen B und D weisen im Vergleich zu den Mutanten aus A, C und E einen pleiotropen Phänotyp auf:

- 1.) Neben Apocytochrom b fehlt in der Regel die Untereinheit I der

Cytochrom c Oxidase; gleichzeitig treten "neue" Translationsprodukte auf (meist in Zwei- bis Dreizahl), wobei mindestens eines jeweils ein höheres Molekulargewicht als Apocytochrom b besitzt. In Abb. 13 sind die Markierungsmuster einzelner Mutanten aus diesen Regionen dargestellt. Bei allen Mutanten der Gruppe D ist die Apocytochrom b -Bande sowie bei einigen Mutanten dieser Gruppe (M3881, M2881) die Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase zu erkennen. Diese fehlen, wenn die Markierung bei nicht-permissiven Bedingungen (18°C) durchgeführt wird (Bechmann-Holzner, unveröffentlicht). Das in Abb. 13 dargestellte Autoradiogramm zeigt das Markierungsmuster bei permissiven Bedingungen (Markierung bei 28°C).

Die Mutanten M3881, M4359, M4751 und M2281 aus D liefern bei Kreuzungen untereinander keine atmenden Rekombinanten. Sie weisen deshalb in der genetischen Karte einen gemeinsamen Ort auf. Die geringfügig verschiedenen Bandenmuster ihrer Translationsprodukte deuten allerdings daraufhin, dass die Entstehung der Mutanten auf unterschiedliche Mutationsereignisse zurückzuführen sind.

Eine Colinearität zwischen der Lage des Mutationsortes und dem Molekulargewicht eines der neu auftretenden Polypeptide ist in den beiden Gruppen B und D nicht zu erkennen. Auffällig ist aber die Gruppenspezifität der "neuen" Banden; keine stimmt hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit mit einer aus der anderen Gruppe überein.

2.) Eine Eigentümlichkeit von B und D ist das häufige Vorkommen temperatursensibler Mutanten. So besteht die Gruppe D ausschließlich aus kältesensiblen Mutanten; in der Gruppe B sind die Hälfte der Mutanten hitzesensibel. Dieses Merkmal erlaubt eine weitere Unterscheidung dieser Gruppen.

3.) Spektrometrisch lassen sich bei Mutanten der beiden Gruppen nach Wachstum unter nicht-permissiven Bedingungen weder Cytochrom b noch Cytochrom aa₃ nachweisen.

8. Bestimmung der freien Mobilität des Apocytochroms b und seiner Fragmente

cob⁻ - Mutanten, die anstelle des Apocytochroms b ein "neues" Polypeptid mit geringerem Molekulargewicht besitzen, wurden im Verlauf dieser Untersuchungen auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Tzagoloff et al. 1976; Mahler et al. 1977; Claisse et al. 1977). Die Autoren vermuteten, ohne einen Nachweis der Colinearität bzw. biochemische Beweise erbringen zu können, dass diese Polypeptide Fragmente des Apocytochroms b darstellen. In den folgenden Experimenten wurde versucht, die Frage nach der Verwandschaft zwischen "neuen" Polypeptiden und Apocytochrom b mit biochemischen Methoden zu beantworten. Sollten sich Homologien nachweisen lassen, so würden dadurch zusätzlich zu der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Colinearität die Strukturanteile der COB-Region definiert werden.

Apocytochrom b präzipitierende Antiseren, mit denen schnell eine immunologische Verwandschaft hätte festgestellt werden können, standen - wie bereits erwähnt (siehe Abschnitt C .3) - nicht zur Verfügung. Es wurden deshalb andere biochemische Eigenschaften untersucht, um Rückschlüsse auf homologe Aminosäuresequenzen zu erhalten.

Das Apocytochrom b zeigt in SDS-Gelen ein ungewöhnliches Laufverhalten. Seine elektrophoretische Beweglichkeit ist nicht wie die der meisten Proteine nur vom Molekulargewicht, sondern zusätzlich von der Acrylamidkonzentration des Gels abhängig. Diese Eigenschaft tritt bei manchen Proteinen mit ungewöhnlicher Ladung oder Konformation, unreduzierten Sulfhydryl-Gruppen oder hohem Kohlehydratanteil auf. Ein Vergleich der Abbildungen 10 und 14 verdeutlicht dieses Phänomen. Sie zeigen die Auftrennung mitochondrialer Polypeptide der gleichen Mutantenstämme bei unterschiedlicher Acrylamidkonzentration. Die elektrophoretische Beweglichkeit des Apocytochroms b nimmt mit steigender Acrylamidkonzentration

tration ab. Bei niedrigen Konzentrationen (bis 12 % Acrylamid) liegt die Apocytochrom b -Bande unterhalb der Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase (Abb. 9), bei höheren Acrylamidkonzentrationen darüber. Diese Eigentümlichkeit ist graphisch in Abb. 15 dargestellt. In dieser ist die elektrophoretische Beweglichkeit (bestimmt als Logarithmus des R_f -Wertes) gegen die Acrylamidkonzentration aufgetragen (Ferguson-Plot). Der Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate bestimmt die freie elektrophoretische Mobilität, d.h., die Mobilität ohne Acrylamid als Träger. Es ist zu erkennen, dass diese beim Apocytochrom b und bei der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase deutlich höher ist als jene der übrigen mitochondrialen Translationsprodukte oder der Standard-Proteine Myoglobin bzw. γ -Globulin.

Die Analyse dieses charakteristischen Verhaltens wurde als Vortest benutzt, um Mutantenproteine als Apocytochrom b -Fragmente zu identifizieren. Abb. 16 zeigt einen Ferguson-Plot, in dem die ermittelten elektrophoretischen Beweglichkeiten verschiedener Mutantenpolypeptide eingetragen sind. Das "neue" Polypeptid der Mutante M4494 (MG 30 500) weist den gleichen Wert wie das Wildtyp-Protein auf. Bei den Mutanten M7-40 (MG 28 000), M1354 (MG 23 000) und M1321 (MG 18 000) nimmt die, für Apocytochrom b bezeichnende, ungewöhnlich hohe freie Beweglichkeit parallel zum Molekulargewicht ab; dennoch lässt sie sich deutlich von der freien Mobilität der Standard-Proteine Myoglobin und γ -Globulin unterscheiden.

Die Abnahme der elektrophoretischen Mobilität in Korrelation zum verringerten Molekulargewicht kann durch einen schrittweisen Verlust jener Sequenzen erklärt werden, die für das anomale Laufverhalten im Gel verantwortlich sind.

9. Eindimensionale Peptidkartierung

9. 1 Charakterisierung der Verdauungsmuster mitochondrialer Translationsprodukte

Ein idealer Weg zum Nachweis der Homologie zwischen dem Wildtyp-Apocytochrom b und den in cob^- -Mutanten an seiner Stelle auftretenden Polypeptiden ist die Analyse der eindimensionalen proteolytischen "fingerprints" nach der Methode von Cleveland et al. (1977). Da die mitochondrialen Translationsprodukte aus SDS-Gelen in radiochemisch reiner Form leicht zu isolieren sind, ist eine Extraktion des Apocytochroms b und der "neuen" Polypeptide aus der inneren Mitochondrienmembran unnötig. Abb. 17 zeigt den Vergleich der Verdauungsmuster des Apocytochroms b und der Untereinheiten I, II und III der Cytochrom c Oxidase nach begrenzter Proteolyse mit Chymotrypsin und Nagarse. In beiden Beispielen ist es offensichtlich, dass die Proteasebehandlung bei allen vier mitochondrial synthetisierten Polypeptiden ein völlig unterschiedliches Fragmentierungsmuster hervorruft. Da die Verdauungsmuster für jedes Protein spezifisch sind, kann mit Hilfe dieser Methode bestimmt werden, ob zwei Polypeptide identisch, verwandt oder vollständig unterschiedlich sind.

9. 2 Charakterisierung der Verdauungsmuster der Apocytochrom b -Fragmente

Aus Abb. 18 geht hervor, dass das in der Mutante M4494 neu auftretende Polypeptid mit dem apparenten Molekulargewicht 30500 und das Wildtyp-Apocytochrom b fast identische Verdauungsmuster nach Spaltung mit Chymotrypsin oder Nagarse besitzen. Dies deutet daraufhin, dass die beiden Polypeptide über weite Strecken homolog sind. Das neue Polypeptid der Mutante kann somit als veränderte inaktive Form von Apocytochrom b angesehen werden. Der Vergleich der Verdauungsmuster der bei M7-40 neu auftretenden

Bande mit dem Wildtyp-Apocytochrom b bringt ein ähnliches Resultat (Abb. 19). Wieder treten nach Proteolyse mit Chymotrypsin oder Nagarse eine Reihe identischer Banden auf. Dies spricht auch bei diesem Polypeptid für eine Sequenzhomologie mit Apocytochrom b. Die Mutation der Mutante M7-40 führte somit zu einem verkürzten Fragment des Apocytochroms b mit einem Molekulargewicht von 28 000. Ein solches verkürztes Polypeptid weist verständlicherweise ein etwas verändertes Verdauungsmuster auf. Im Vergleich zur Mutante M4494 treten bereits mehr mutanteneigene Proteolysebanden auf. Abb. 20 zeigt zwei weitere Beispiele von Verdauungsmustern "neuer" Polypeptidbanden der Mutanten M1354 und M1321. Wieder finden sich im Vergleich zum Wildtyp-Apocytochrom b eine Zahl identischer Banden. Auch diese "neuen" mitochondrialen Translationsprodukte mit den apparenten Molekulargewichten 23 000 und 18 000 erweisen sich daher mit grosser Wahrscheinlichkeit als Fragmente des Apocytochroms b.

Mutationen in den Bereichen E und C (wahrscheinlich auch in A) können somit zu veränderten Polypeptid-Homologen des Apocytochroms b führen, die entweder grösser (im Falle der Mutante M4494) oder kleiner als das Wildtypprotein sind. Bei diesem Sachverhalt lässt sich der Schluss ziehen, dass die entsprechenden, zur Polypeptidlänge colinearen Mutationsorte die Strukturanteile des Apocytochroms b markieren.

D. Diskussion

I. Synthese mitochondrialer Proteine im *in vitro* System

Im Prinzip stellt die zellfreie mtRNS-abhängige Synthese spezifischer Proteine eine Möglichkeit dar, den genetischen Informationsgehalt der mtDNS zu bestimmen. Im konkreten Fall führte die *in vitro* Translation der mtRNS zu unerwarteten Schwierigkeiten, die eine Beantwortung der Fragestellung mit den zur Verfügung stehenden Mitteln zur Zeit unmöglich macht.

In Abhängigkeit der mtRNS synthetisierte Polypeptide liessen sich mit keinem der authentischen mitochondrialen Translationsprodukte korrelieren. Ein geringer Anteil dieser Polypeptide reagierte mit Antikörpern, die gegen mitochondriale Membranproteine gerichtet sind. Reine Cytochrom c Oxidase drängt die Immunpräzipitation vollständig zurück, was darauf hindeutet, dass die antigen wirkenden Bereiche der *in vitro* Produkte auch in den Komponenten dieses Enzyms vorkommen. Ein Nachweis der *in vitro* Synthese des Apocytochroms b bzw. von antigenen Determinanten dieses Polypeptids gelang mit den vorhandenen Seren nicht.

Unerwartet war der Befund, dass das Antimembranserum nur Polypeptide mit einem Molekulargewicht unter 13 000 aus den *in vitro* Ansätzen fällt. Noch kleiner (MG unter 8 000) waren die Produkte, die Moorman et al. (1978a) nach mtRNS-abhängiger *in vitro* Synthese mit Seren gegen den Cytochrom c Oxidase-Komplex bzw. dessen mitochondrial synthetisierte Untereinheiten präzipitieren. Die Autoren nehmen an, dass diese Polypeptide Teilstücke der Untereinheiten I, II und III der Cytochrom c Oxidase darstellen und ziehen zur Erklärung ihrer unvollständigen Synthese im *in vitro* System folgende Möglichkeiten in Betracht:

1.) Die heterologe mtRNS wird an E. coli Ribosomen nicht im

richtigen Leserahmen gelesen; Jedes dadurch erzeugte Stoppcodon führt zum vorzeitigen Beenden der Translation.

2.) Die Ionenbedingungen im in vitro System sind nicht optimal für spezifische Initiation und Elongation.

3.) Die kurzen Polypeptide sind auf Protease- bzw. Nukleaseaktivität zurückzuführen.

4.) Die Synthese der hydrophoben mitochondrialen Polypeptide erfordert eine vektorielle Translation durch Membran-gebundene Ribosomen.

5.) Die Translation der mtRNS benötigt spezifische tRNSs, die nicht im E. coli System vorhanden sind.

Die korrekte Translation der M12 Phagen-RNS sowie die mtRNS-abhängige Synthese antigenener Determinanten, die auch in den Untereinheiten I, II und III der Cytochrom c Oxidase vorkommen, im E. coli-System bei identischen Ionenbedingungen, sprechen gegen die ersten drei genannten Möglichkeiten. Ob oder welche der beiden letztgenannten Möglichkeiten zutreffen, lässt sich derzeit experimentell nicht beantworten.

Nach Meinung von Küntzel und Mitarbeiter (1974, 1975) sind die kurzkettigen mitochondrialen Polypeptide die authentischen primären Translationsprodukte, die in vivo im Mitochondrium zu einem vollständigen Polypeptid zusammengesetzt werden. Als Begründung ihrer Hypothese führten die Autoren an, dass sie die Synthese kurzer Polypeptide bei *Neurospora crassa* sowohl in vivo als auch in vitro beobachten konnten. Ob ein derartiger Proteinsynthesemechanismus in den Mitochondrien tatsächlich vorliegt, ist allerdings zu bezweifeln. Die Möglichkeit einer proteolytischen Degradation, die zu kurzen Polypeptiden führt, konnte bisher nicht überzeugend widerlegt werden. Ausserdem traten bei Hefe nach Pulsmarkierungen (Pulsdauer 1 - 10 Min) ganzer Zellen oder isolierter Mitochondrien niemals kurzkettige Polypeptide

auf (Schatz und Mason, 1974; Poyton und Groot, 1975; Groot und van Harten-Loosbroek, 1976). Die in solchen Experimenten markierten Polypeptide zeigten in SDS-Gelen stets die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit wie die mitochondrial synthetisierten Komponenten der Cytochrom c Oxidase bzw. des bc_1 -Komplexes.

Alle bisher zusammengetragenen Ergebnisse über die in vitro Translation der mitochondrialen RNS lassen den Schluss zu, dass das mitochondriale Proteinsynthesesystem bei allen bisher untersuchten Organismen hinsichtlich seiner Erfordernisse und seiner Eigenschaften wesentlich von dem des Cytoplasmas' als auch von dem der Bakterien abweicht. Weder im E.coli-System (Rosen und Edelman, 1976; Kroon et al. 1976; Moorman et al. 1977) noch in den eukaryotischen Systemen von Retikulozyten, Xenopus-Oozyten oder Weizenkeimen (Moorman et al. 1977) liess sich bisher eine korrekte Synthese kompletter mitochondrialer Proteine zeigen. Diese Inkompatibilität der mtRNS mit heterologen zellfreien Systemen deutet auf das Vorhandensein einer starken Translationsbarriere zwischen den einzelnen Systemen hin. Dies ist insofern bemerkenswert, als eukaryotische Systeme beschrieben sind, die bakteriellen Messenger - wenn auch mit geringer Effizienz - korrekt translatieren können (Davies und Kaesberg, 1973; Beck und Gassen, 1977); das gleiche gilt auch umgekehrt für die Translation eukaryotischer mRNS in E.coli-Systemen (Hartley et al. 1975; Moorman et al. 1976; Greenblatt et al. 1976).

Die neuesten Befunde, wonach einige der mitochondrialen Strukturgene "intervening sequences" aufweisen und somit Mosaikstruktur besitzen (Bos et al. 1978; Bernardi G., 1978; Haid et al. 1979), lassen darauf schliessen, dass das mitochondriale genetische System eine eigene spezifische Form der Expression dieser Gene besitzt. Diese Annahme wird gestützt durch Untersuchungen von Van Ormen et al. (1977). Die Auto-

ren hybridisierten elektrophoretisch fraktionierte mtRNS gegen mtDNS-Restriktionsfragmente und konstruierten mit dieser Technik eine Transkriptionskarte des mitochondrialen Genoms. Dabei stellten sie fest, dass in vielen Regionen der mitochondrialen DNS die hybridisierende RNS länger ist, als für die Codierung des spezifizierten Proteins notwendig wäre. Darüberhinaus gibt es Hinweise, dass grosse Transkripte durch "processing" zu kleineren RNS-Species verkürzt werden (Van Ommen, persönliche Mitteilung; Haid et al., unveröffentlicht). Zusammengefasst deuten die Befunde auf das Vorhandensein eines Transkriptions- und Translationsapparates in Mitochondrien hin, der nach Bildung einer RNS-Kopie des Gesamtgens diese durch spezifisches "splicing" zur eigentlichen mRNA umwandelt bzw. verkürzt. Ein derartiger, den Mitochondrien eigener Mechanismus der Genexpression könnte die nicht korrekte Translation von mtRNS in heterologen Systemen erklären.

Obwohl erste Versuche, mtRNS im komplett homologen System, d.h. in Extrakten aus isolierten Mitochondrien, zu synthetisieren, noch nicht zufriedenstellende Ergebnisse lieferten (Küntzel und Bloosey, 1974; Moorman et al. 1977), scheint die Erstellung eines solchen funktionsfähigen in vitro Systems für die Charakterisierung der mitochondrialen mRNA-Species und für die Untersuchungen der mitochondrialen Genexpression sowie ihrer Regulation dringend geboten.

II. Das Strukturgen für Apo-Cytochrom *b* und seine Organisation

Hauptziele der Mitochondrienforschung sind gegenwärtig die Identifizierung der Genorte des mitochondrialen Genoms, die Bestimmung der codierten Produkte sowie die Analyse der Art der Codierung. Ein bevorzugtes Interesse in diesen Studien fand in den letzten Jahren die sogenannte COB-Region, ein die Expression von Cytochrom *b* kontrollierendes Segment der mtDNS, das als COB- oder BOX-Region bezeichnet wurde und zwischen den Gen-

orten OLI 1 und OLI 2 liegt (Abb. 1). In dieser Region wurden die Loci COB 1 und COB 2 (Tzagoloff et al. 1976) sowie die Loci BOX 1,2,3,4,5 und 6 (Kotylak und Slonimski 1976, 1977) lokalisiert. Im gleichen Abschnitt kartieren Mutationen, die zur Resistenz gegen Inhibitoren des Elektronenflusses im bc_1 -Komplex führen; 2 Diuron-Resistenz-Loci DIU, 2 Mucidin-Resistenz-Loci MUC, 2 Antimycin-Resistenz-Loci ANA sowie ein Funiculosin-Resistenz-Locus FU konnten bisher identifiziert werden. Diese Häufigkeit der Loci war bisher nur schwer mit dem Befund in Einklang zu bringen, wonach nur eines der sieben Polypeptide des bc_1 -Komplexes an den mitochondrialen Ribosomen synthetisiert wird - das Apocytochrom b (siehe Einleitung zu Teil 2). Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse ermöglichten es aber, die genetische Struktur der COB-Region zu entschlüsseln und die bisher widersprüchlichen Einzelaussagen zu einem geschlossenen Bild zu vereinigen.

A.) Die COB-Region enthält ein Strukturgen für Apocytochrom b.

25 der untersuchten cob^- -Mutanten (von insgesamt 35) weisen als einzigen Defekt einen Funktionsverlust der QH_2 -Cytochrom c Reduktase auf. Während zwei Mutanten Apocytochrom b noch synthetisieren können, fehlt 23 Mutanten dieses Polypeptid. Bei 17 Mutanten tritt statt dessen ein neues mitochondrial synthetisiertes Polypeptid auf. Wie aus Abb. 21a zu ersehen ist, kartieren die Mutationsorte dieser Mutanten ohne Ausnahme in drei Abschnitten, die als A, C und E bezeichnet werden. Diese Abschnitte kennzeichnen mit hoher Wahrscheinlichkeit den das Apocytochrom b codierenden Bereich der mtDNS. Dafür spricht vor allem der erstmals geführte Nachweis einer colinearen Beziehung zwischen der Grösse jener Polypeptide, die in den 17 zuvor erwähnten Mutanten anstelle des Apocytochroms b synthetisiert werden, und der Lage des entsprechenden Mutationsortes. Für fünf neue Polypeptide mit Molekulargewichten zwischen 30 000 und 18 000 konnte durch vergleichende Analysen der elektrophoretischen Beweglich-

keiten bzw. der Peptidfragmente nach begrenzter Proteolyse gezeigt werden, dass es sich um homologe Formen des Apocytochroms b handelt. Das Auftreten dieser Fragmente lässt sich als Folge der mutativen Entstehung eines Stoppcodons in der mtDNS deuten, das einen Kettenabbruch während der Translation bewirkt. Die Position solcher Basentriplets markieren Sequenzen des Strukturgens.

Die zwischenzeitlich durchgeführte Analyse weiterer cob^- -Mutanten (Bechmann-Holzner, unveröffentlicht) führte zum Auffinden zusätzlicher Fragmentmutanten. In allen Fällen fügten sich die ermittelten Polypeptidlängen in die hier dargestellte colineare Gesetzmässigkeit.

Eine Mutation im Abschnitt C der COB-Region führt zu einem veränderten Cytochrom b Spektrum. Im Vergleich zum Wildtyp ist die Absorptionslinie um 1,5 nm nach Rot verschoben. Das veränderte Spektrum dürfte auf eine "missense"- Mutation zurückzuführen sein, die eine geringfügige Strukturveränderung des Cytochroms b bewirkt. Sie beeinflusst zwar die Funktion, nicht aber die Bildung dieses Cytochroms. Neben Kettenabbruch-erzeugenden Mutationen kennzeichnen auch "missense"- Mutationen codierende Sequenzen.

Unabhängig von diesen Ergebnissen sprechen noch weitere Befunde dafür, die Abschnitte A, C und E als Strukturgenanteile des Apocytochroms b anzusehen:

1.) In jüngster Vergangenheit - nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit - ist es gelungen, Antiseren gegen Apocytochrom b zu gewinnen. Immunologische Versuche erbrachten als Ergebnis, dass "neue" Polypeptide der cob^- - Mutanten mit MG von 10 000 bis 30 500 mit diesen Seren reagieren; sie stellen deshalb Homologe des Apocytochroms b dar (Solioz M., in Vorbereitung; Kreike J. et al., in Vorbereitung; Bechmann-Holzner et al., unveröffentlicht).

2.) Mutationen in den Abschnitten A, C und E komplementieren

nicht miteinander (Haid et al. 1979).

In Mutanten der Gruppe A, deren Mutationen an 6 Orten im OLI 2-nahen Teil von COB lokalisiert werden, konnte kein Fragment anstelle des fehlenden Apocytochroms b nachgewiesen werden. Möglicherweise werden kleine Fragmente nicht in den bc_1 -Komplex integriert und deshalb bevorzugt abgebaut. Andere Deutungsmöglichkeiten wären, a) dass solche Fragmente nicht mehr ausreichend mit $^{35}\text{SO}_4^{--}$ markiert werden und somit durch Autoradiographie nicht mehr nachweisbar sind oder b) dass sie während der Isolation der Mitochondrien verloren gehen. Gegenwärtig kann deshalb nur für den OLI 2-fernen Teil von A, sowie für C und E nachgewiesen werden, dass sie Teile des Strukturgens sind.

Die experimentellen Befunde dieser Arbeit ermöglichten es weiter, die bisher unbekannte Richtung der Transkription im Apocytochrom b Gen festzulegen: Sie verläuft von OLI 2 nach OLI 1. Diese Annahme wird durch folgende Sachverhalte gestützt:

- 1.) Die Grösse der Mutantenfragmente, die wahrscheinlich durch Kettenabbruch entstanden sind, nimmt mit zunehmendem Abstand zum OLI 2-Ende zu (Colinearität).
- 2.) Die Mutante M4494 mit einer grösseren Form des Apocytochroms b (MG 30500) entsteht wahrscheinlich durch ein Überlesen des Terminationssignales; ihr Mutationsort grenzt an den Genort OLI 1 an.

Fragmentmutanten wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Tzagoloff et al. 1976; Mahler et al. 1977; Claisse et al. 1977). Die Autoren schlossen, dass deren Mutationsorte die, das Apocytochrom b codierenden Sequenzen der COB-Region markieren. In den genetischen (Bechmann-Holzner, unveröffentlicht) bzw. biochemischen Studien wurden einige Mutanten dieser Arbeitsgruppen mituntersucht, um Vergleiche mit den von ihnen

erstellten genetischen Karten der COB-Region ziehen zu können.

Tzagoloff et al. (1976) unterteilten die COB-Region in die Loci COB 1 und COB 2. Da die Mutationsorte der von den Autoren beschriebenen zwei Fragmentmutanten (MG über 18 000) in COB 2 liegen, wurde dieser Locus als Strukturgen definiert. COB 2 ist teilweise deckungsgleich mit den Abschnitten E und C dieser Arbeit; also jenen, die höhermolekulare Polypeptide (MG 15 000 - 30 500) liefern.

Claisse et al. (1977) postulierten 3 Strukturgene. Die Grössen der "neuen" Polypeptide der von ihnen analysierten Fragmentmutanten betragen: MG 13 400 und 13 700 (Gen 1), MG 17 300 und 18 500 (Gen 2), MG 22 500 und 26 600 (Gen 3). Die Position dieser Loci deckt sich etwa mit denen der in dieser Arbeit beschriebenen Abschnitte A, C und E. Ebenfalls in diesen Abschnitten kartieren auch jene Mutationen, die zur Resistenz gegen die Inhibitoren des bc_1 -Komplexes führen (Pratje und Michaelis, 1977; Colson und Slonimski, 1977, 1979).

Längere Zeit war unklar, ob mehr als eine Form des Apoproteins von Cytochrom b in den Mitochondrien vorkommen (Weiss und Ziganke, 1974). Die spektrale Analyse der Hefe-Cytochrome sowie die säulenchromatographische Trennung des Apocytochroms b aus *Neurospora crassa* stützten eine solche Annahme. Folgende Ergebnisse sprechen aber für die Existenz nur eines Apocytochroms b:

- 1.) Die meisten cob^- -Mutanten verloren als Ergebnis einer einzigen Mutation, die revertieren kann, Apocytochrom b vollständig.
2. Die topographische Korrelation von Mutationsort und Fragmentgrösse beweist, dass nur ein einziges Genprodukt vorliegt.

B.) Die COB-Region ist ein Mosaikgen.

10 der untersuchten cob^- -Mutanten besitzen einen pleiotropen Phänotyp. Sie weisen einen gemeinsamen Funktionsverlust des bc_1 -Komplexes und der Cytochrom c Oxidase auf. Die Mutanten haben

in der Regel sowohl Cytochrom b als auch Cytochrom aa₃ verloren; parallel dazu fehlen die mitochondrialen Translationsbanden des Apocytochroms b und der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase. Ein weiteres Charakteristikum dieser Mutanten ist ihre Konditionalität.

Die Mutationsorte der Mutanten liegen in den zwei Abschnitten B und D, die eingeschachtelt in das Strukturgen (Abschnitte A - C - E) des Apocytochroms b sind (Abb. 21a). In Komplementationsanalysen verhalten sich die Mutanten des Abschnittes B als eigene Gruppe (Haid et al. 1979). Über die Funktion der beiden Insertionen kann derzeit nur spekuliert werden. Es wäre denkbar, dass diese Regionen in der Regulation bestimmter Prozesse, wie z. B. der Katabolitrepression, beteiligt sind. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass sie Enzyme, die für das "processing" der mRNS-Vorstufen verantwortlich sind, codieren. Es lässt sich derzeit auch nicht ausschliessen, dass diese beiden Bereiche Strukturgenanteile einer Komponente der Cytochrom c Oxidase enthalten.

Zusammengefasst sprechen die experimentellen Befunde für eine mosaikförmige Struktur der COB-Region mit mindestens fünf eindeutig voneinander abgesetzten Abschnitten. Ihre Orientierung im mitochondrialen Genom lautet: OLI 2 - A - B - C - D - E - OLI 1. Zusätzliche, von den vorliegenden Untersuchungen unabhängige Ergebnisse stützen die dargelegten Vorstellungen:

1.) Restriktionsanalysen der COB-Region ermöglichten deren Größenbestimmung. Dieser Bereich der mtDNS ist mindestens 6 000 Basenpaare lang; dies entspricht etwa dem Siebenfachen der Länge, die für die Codierung des Apocytochroms b benötigt wird (Slonimski et al. 1978; Grosch et al., unveröffentlicht).

2.) Die elektronenmikroskopische Analyse der Heteroduplices von RNS-Transkripten der COB-Region und DNS-Restriktionsfragmenten führte zur Entdeckung einzelsträngiger DNS-Loops (Arnberg et al., unveröffentlicht), die darauf hindeuten, dass RNS-

Transkripte von COB Bereiche vereinigen, die auf der mtDNS voneinander getrennt sind.

Zumindest ein weiteres mitochondriales Gen - das Gen der 21 S rRNS - besitzt ebenfalls eine Mosaikstruktur (Bos et al. 1978; Faye et al. 1979). Vorläufige Ergebnisse deuten auch auf "intervening sequences" in den Genen des Var 1-Proteins (Strausberg et al. 1978) und der Untereinheiten I (Moorman und Grivell, 1977) und II (Weiss-Brummer et al., unveröffentlicht) der Cytochrom c Oxidase hin.

Mosaikgene sind somit nicht nur auf den Zellkern beschränkt (zur Übersicht siehe Darnell J. E., 1978); sie treten ebenfalls in der mtDNS auf. Dieser Befund schwächt die Hypothese vom prokaryotischen Ursprung der Mitochondrien und stützt dafür die Behauptungen von Prunell und Bernardi (1974), wonach die mtDNS in ihren biochemischen Eigenschaften mehr der Kern-DNS als einer Prokaryonten-DNS ähnelt.

Die Expression der Mosaikgene erfordert nach den heutigen Vorstellungen das Spalten primärer RNS-Transkripte und das Zusammenfügen der codogenen Teilstücke zu translatierbarer RNS. Die Biochemie dieser mRNS-Bildung in Eukaryonten weist im Vergleich zu jener in Prokaryonten beträchtliche Unterschiede auf (Darnell J. E., 1978). Es erscheint deshalb nicht mehr gerechtfertigt, zum Studium der Genexpression in eukaryotischen Zellen Bakterienmodelle zu verwenden.

Mitochondrien der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit ihrem relativ kleinen und genetisch gut charakterisierten Genom bieten sich als attraktives Versuchssystem an, um die Natur und die Evolution der Geninsertionen und jener Enzyme, die das korrekte "processing" der Primärtranskripte katalysieren, zu studieren.

E. Tabellen und Abbildungen

T a b e l l e I

Stamm	Genotyp		Bemerkung	Herkunft
	Kerngenotyp	mitochondrialer Genotyp		
777-3 A	α , ade 2, op 1	rho ⁺	Wildtyp, Kontrolle für cob ⁻ -Mutanten, die von diesem Stamm abgeleitet sind	Kováčová et al. (1968)
M1231 - M4959	α , ade 2, op 1	rho ⁺ , cob ⁻	abgeleitet von 777-3 A	Schweyen et al. (1977)
G1334 - G2494	α , ade 2, op 1	rho ⁺ , cob ⁻	abgeleitet von 777-3 A	Kotylak und Slonimski (1976)
M7-40	α	rho ⁺ , cob ⁻	abgeleitet von D273-10 B	Slonimski und Tzagoloff (1976)
D273-10 B	α	rho ⁺	Wildtyp	F. Sherman (1965)
KL14-4 A	a, his 1, trp 2	rho ⁺ , CAP ^r -321 OLI ^r 1-1, PAR ^r -454	verwendet zur Kreuzung mit cob ⁻ -Mutanten, um OP1, cob ⁻ -Diploide zu erhalten	Wolf et al. (1973)
M590-9 D	a, trp 1	rho ⁺ , CAP ^r -321, ERY ^r -221, OLI ^r 1-1, ANA ^r -101, PAR ^r -454	verwendet zur Kreuzung mit cob ⁻ -Mutanten, um OP1, cob ⁻ -Diploide zu erhalten	Schweyen et al. (1978)

T a b e l l e I I

Stimulierung des ^{35}S -Methionineinbaus in Abhängigkeit der M12-Phagen-RNS und mtRNS im zellfreien E. coli-System.

Versuchsbedingungen wie in Material und Methoden beschrieben.

Die Konzentration von ^{35}S -Methionin (35 Ci/mmol) beträgt 2,85 μM . Die Stimulation errechnet sich als das Verhältnis der RNS-abhängigen Proteinsynthese zur endogenen Proteinsynthese.

Inkubationsansatz	Einbau (cpm/10 μl)		RNS-abhängige Stimulation
	0 Min	40 Min	
ohne RNS	1130	2983	-
M12 RNS (0,15 mg/ml)	1268	44627	23
mtRNS (0,2 mg/ml)	1245	16295	8
mtRNS ohne tRNS	1245	13687	7
mtRNS ohne Leucovorin	1182	5703	2,5

T a b e l l e I I I

Spezifische Immunpräzipitation der in Abhängigkeit der mtRNS in vitro synthetisierten Polypeptide.

Pro Ansatz wurden ca. 42 000 TCA-fällbare cpm eingesetzt.
Die angegebenen %-Anteile sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

Antiseren	Nach <u>in vitro</u> Synthese immunpräzipitierbarer Anteil (%)	
	mtRNS	ohne RNS (endogene Kontrolle)
Kontrollserum	1,6	1,4
Anti-Cytochrom <u>c</u> Oxidase	3,2	1,8
Anti-Cytochrom <u>c</u> Oxidase + 100 µg unmarkierte Cytochrom <u>c</u> Oxidase	1,7	1,3
Anti-mitochondriale Membranen	2,3	1,6
Anti-mitochondriale Membranen + 100 µg unmarkierte Cytochrom <u>c</u> Oxidase	1,6	1,3

Tabelle IV

Mutante	Spektrale Banden der Cytochrome		Tempe- ratur- sensitivität	Mitochondriale Translationsprodukte			Wichtigste Gruppeneigenschaften
	b	aa ₃		Apo- cyto- chrom b	Oxi- dase unter- einheit I	"neue" MG in Kilo- daltons	
M1231	-	+	-	-	+		alle Mutanten besitzen Cytochrom c Oxidase Untereinheit I
M1624	-	+	-	-	+		
M1625	-	+	-	-	+		
M1391	-	+	-	-	+		
M4205	-	+	-	-	+		
M4151	-	+	-	-	+		die meisten Mutanten sind nicht-konditional
G1334	-	+	-	-	+	13,4	
M1322	-	+	-	-	+	13,7	
M4901	-	+	-	-	+	15	
M1301	-	+	-	-	+	15	
M4873	-	+	ts	-	+	15	
M4111	-	-	-	-	-	42; 15	den meisten Mutanten fehlt die Cytochrom c Oxidase Untereinheit I, viele sind konditional, "neue" Banden mit MG > 30 000
M1282	-	-	ts	-	±	41,8; 15	
M1233	-	-	-	-	-	38; 15	
M4218	-	-	ts	-	-	38; 15	
G1370	-	-	-	-	-		
M4959	-	+	cs/ts	-	+		
M4881	-	+	-	-	+	15,5	alle Mutanten besitzen Cytochrom c Oxidase Untereinheit I
M2011	-	+	-	-	+	16,4	
M4434	-	+	-	-	+	17	
M4721	+	+	-	+	+		alle Mutanten sind nicht-konditional
M1321	-	+	-	-	+	18	
M4929	-	+	-	-	+	18	
G2286	-	+	-	-	+	18,8	
M4924	-	+	-	-	+	19,7	
M4410	+	+	-	+	+		
M4751	-	-	cs/ts	-	-	69; 36; 28; 23	alle Mutanten sind kondi- tional und haben "neue" Polypeptide mit MG > 30 000
M4359	-	-	cs/ts	-	-	36; 23; 12	
M3881	-	+	cs	-	+	36; 28; 23	
M2281	-	-	cs	-	-	36; 28; 23	
G2494	-	+	-	-	+	22	alle Mutanten sind nicht- konditional und besitzen die Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase
M1354	-	+	-	-	+	23	
M4891	-	+	-	-	+	25	
M7-40	-	+	-	-	+	28	
M4494	-	+	-	-	+	30,5	

Zusammenfassung der wichtigsten phänotypischen Eigenschaften der untersuchten cob⁻-Mutanten. sind in der Reihenfolge ihrer Kartierungsorte vom OLI2-nahen Ende der COB-Region be-
nennend von oben nach unten aufgeführt.

Kürzungen:

= Gruppe (Cluster); Spektrale Banden der Cytochrome: - fehlen, + vorhanden; Temperatur-
sensitivität: ts = hitzesensibel, cs = kältesensibel; Mitochondriale Translationsprodukte: - fehlen,
vorhanden, ± in geringen Mengen vorhanden

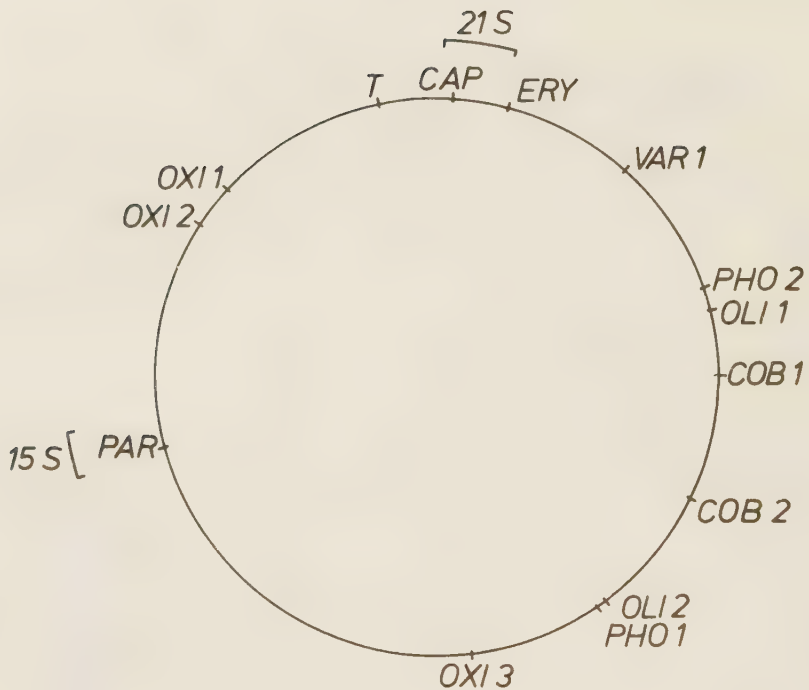


Abb. 1

Genetische Karte des mitochondrialen Genoms der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*; modifiziert nach Borst et al. (1977).

ERY, CAP, PAR, OLI bezeichnen Loci für Erythromycin-, Chloramphenicol-, Paronomycin- und Oligomycinresistenz; OXI 1, 2, 3 sind Genorte, welche die Biosynthese der Cytochrom *c* Oxidase betreffen; T bezeichnet einen Genort, der die Stabilität der mtDNS beeinflusst; PHO 1 und 2 sind Loci, welche die Biosynthese des Oligomycin-sensitiven ATPase-Komplexes betreffen; COB 1 und 2 bezeichnen zwei, die Biosynthese des Cytochroms *b* betreffende Loci; VAR 1 ist der Genort eines polymorphen Proteins mit bisher unbekannter Funktion. Die Loci der 21 S rRNS und der 15 S rRNS sind mit  gekennzeichnet.

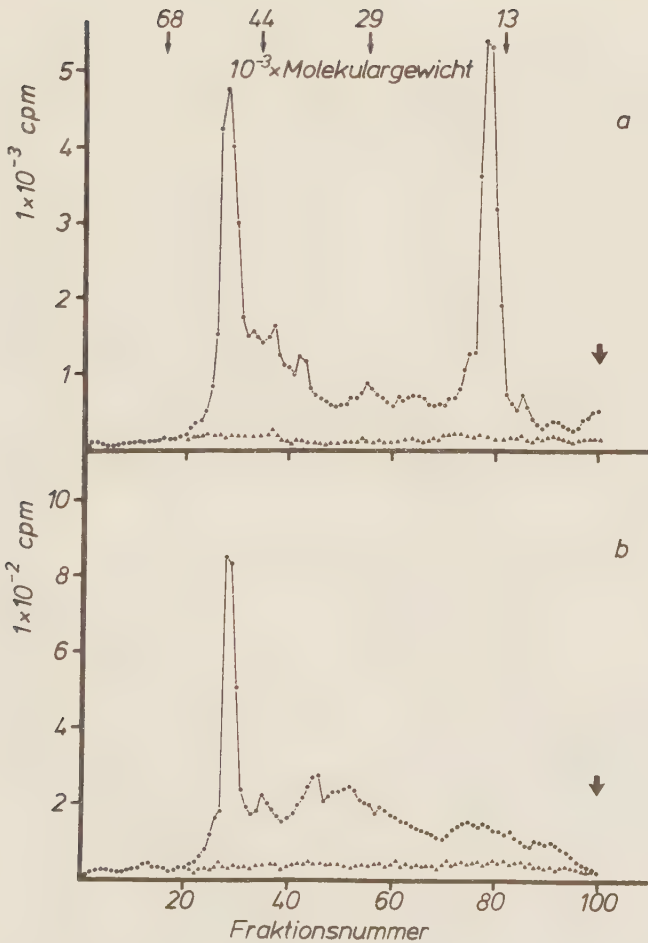


Abb. 2

Elektrophoretische Charakterisierung der in Abhängigkeit von M 12 Phagen-RNS in vitro synthetisierten Proteine.

- a) nach Markierung mit ^3H -Leucin
- b) nach Markierung mit ^3H -Histidin

Die Auftrennung erfolgte in 10% SDS-Polyacrylamidgelen.

↓ bezeichnet die Position des Frontindikators.

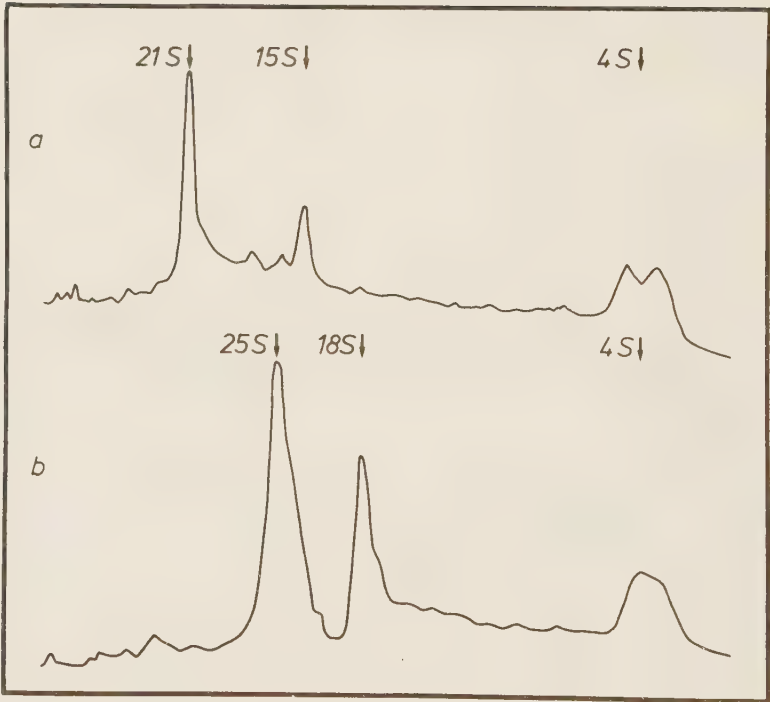


Abb. 3

RNS-Polyacrylamid-Elektrophorese in Gegenwart von Formamid.

a) mitochondriale RNS

b) cytoplasmatische RNS

Die RNS wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, extrahiert und elektrophoretisiert. Nach Methylenblau-Anfärbung wurden die Gele bei 660 nm densitometriert.

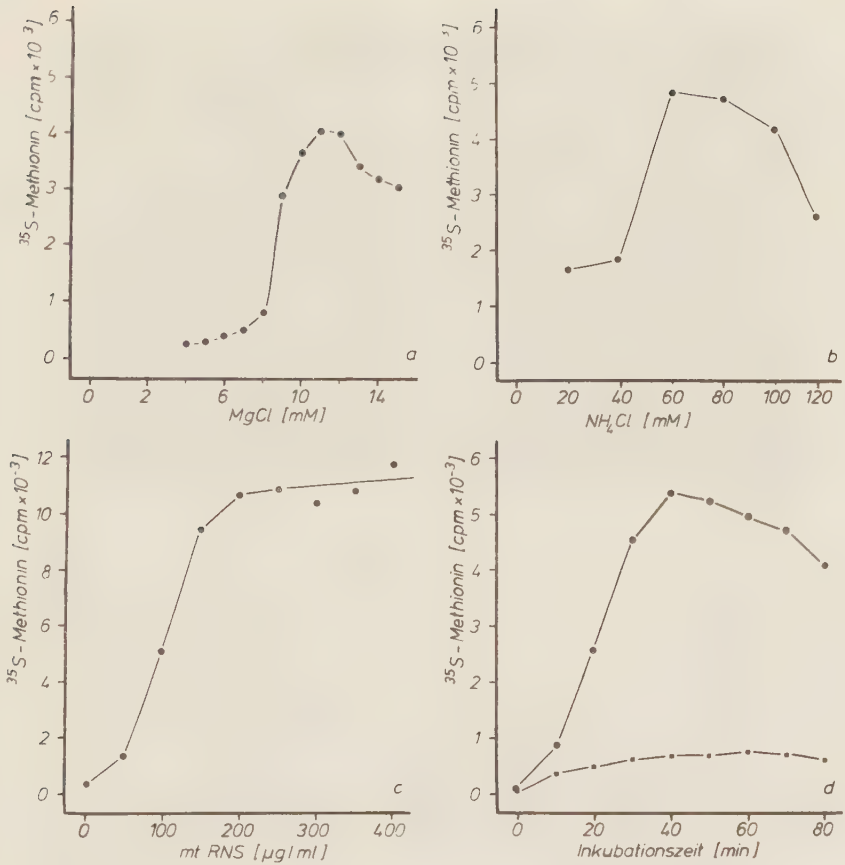


Abb. 4

Charakterisierung der mtRNA-abhängigen in vitro Proteinsynthese in einem zellfreien E.coli System. Die Stimulierung des Einbaus von ^{35}S -Methionin in Protein pro 10 μl Inkubationsextrakt ist als Funktion der Magnesiumionenkonzentration (a), der Ammoniumionenkonzentration (b), der Konzentration der eingesetzten RNS (c) und der Zeit (d) dargestellt. Die Konzentration von ^{35}S -Methionin (2,8 Ci/mmol) betrug 3,5 μM .

●—●—●—: mtRNA abhängiger Einbau

■—■—■—: endogene Kontrolle (ohne RNS)

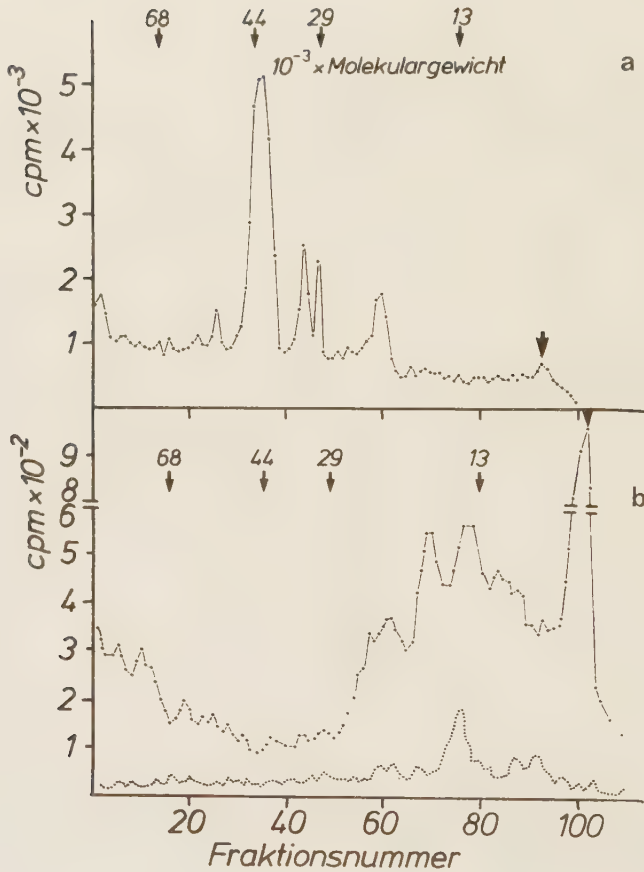


Abb. 5

Markierungsmuster mitochondrialer Polypeptide nach elektrophoretischer Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen.

- a) in vivo Produkte der mitochondrialen Proteinsynthese; Hefezellen wurden in Gegenwart von CHX mit ^{35}S -Methionin pulsmarkiert und die isolierten Mitochondrien elektrophoretisiert.
- b) in vitro Translationsprodukte (^{35}S -Methionin markiert), die mtRNS-abhängig im E. coli System synthetisiert werden (—•—•—); Endogene Kontrolle (ohne mtRNS:).

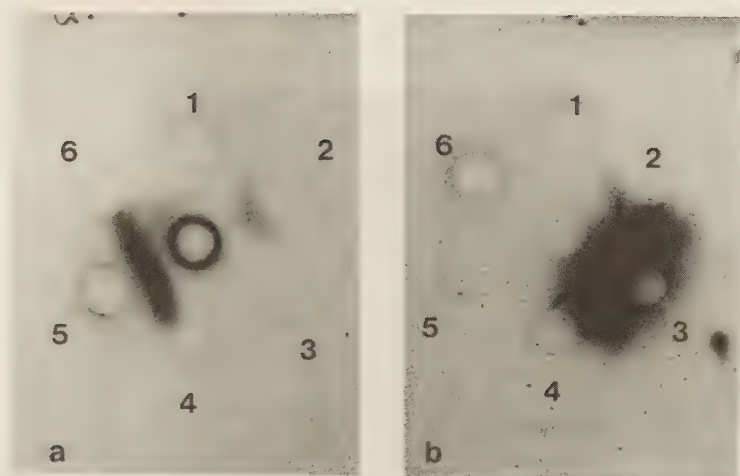


Abb. 6

Ouchterlony-Immuddiffusionstest:

a) Das zentrale Loch enthielt solubilisiertes Mitochondrienprotein (1 mg/ml).

Loch 1: Kontrollserum

Loch 2: Antiserum gegen mitochondriales Membranprotein

Loch 3: Anti-S-30-Serum

Loch 4: Antiserum gegen Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase

Loch 5: Antiserum gegen Holo-Cytochrom c Oxidase

Loch 6: Antiserum gegen Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase

b) Das zentrale Loch enthielt *E. coli* S-30-Extrakt (5 mg/ml).

Loch 1: Kontrollserum

Loch 2: Antiserum gegen Holo-Cytochrom c Oxidase

Loch 3: Antiserum gegen *E. coli* S-30-Extrakt

Loch 4: Antiserum gegen Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase

Loch 5: Antiserum gegen Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase

Loch 6: Antiserum gegen mitochondriale Membranproteine

Die Immunplatten wurden wie unter Material und Methoden beschrieben, behandelt. Pro Loch wurden 10 μ l zugesetzt.

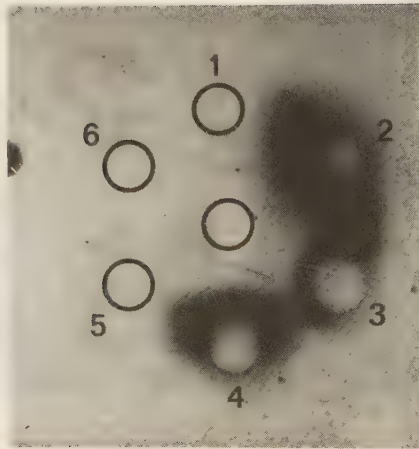


Abb. 7

Ouchterlony-Immundiffusionstest:

Reaktion verschiedener Antiseren (10 μ l) gegen isolierte Cytochrom c Oxidase.

Das zentrale Loch enthielt 10 μ l Cytochrom c Oxidase (0,5 mg/ml)

Loch 1: Kontrollserum

Loch 2: Antiserum gegen Holo-Cytochrom c Oxidase

Loch 3: Antiserum gegen mitochondriales Membranprotein

Loch 4: Antiserum gegen Untereinheit II der Cytochrom c Oxidase

Loch 5: Anti-F₁-ATPase-Serum

Loch 6: Anti-S-30-Serum

Im Autoradiogramm nicht mehr sichtbare Löcher wurden mit O dargestellt.

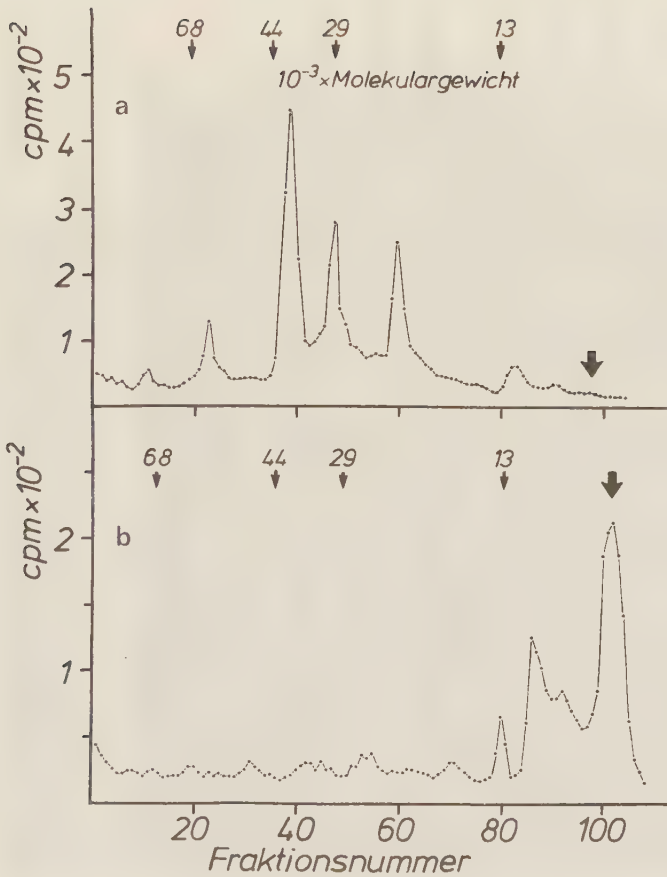


Abb. 8

Elektrophoretische Analyse mitochondrialer ³⁵S-markierter Polypeptide, die mit Antiserum gegen mitochondriales Membranprotein gefällt wurden.

a) nach in vivo Markierung in Gegenwart von CHX

b) nach in vitro Synthese in Abhängigkeit von mtrNS

▼ bezeichnet die Position des Frontindikators.

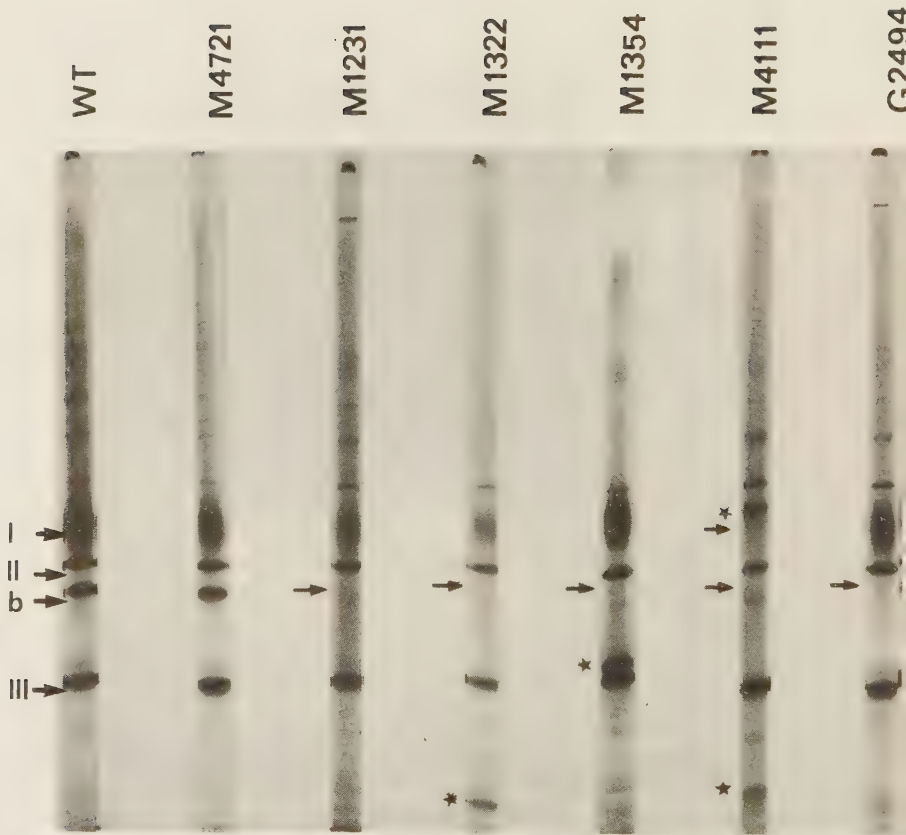


Abb. 9

SDS-Elektrophorese mitochondrialer Translationsprodukte des Wildtyps 777-3A und verschiedener *cob*⁻ - Mutanten in Polyacrylamid-Gradientengelen (10 - 15 % Acrylamid).

I, II, III bezeichnen die Untereinheiten I, II, III der Cytochrom c Oxidase; b markiert das Apocytochrom b.

Die kleinen Pfeile (→) weisen auf den Verlust einer Bande hin; Sterne (★) markieren neu auftretende Banden.

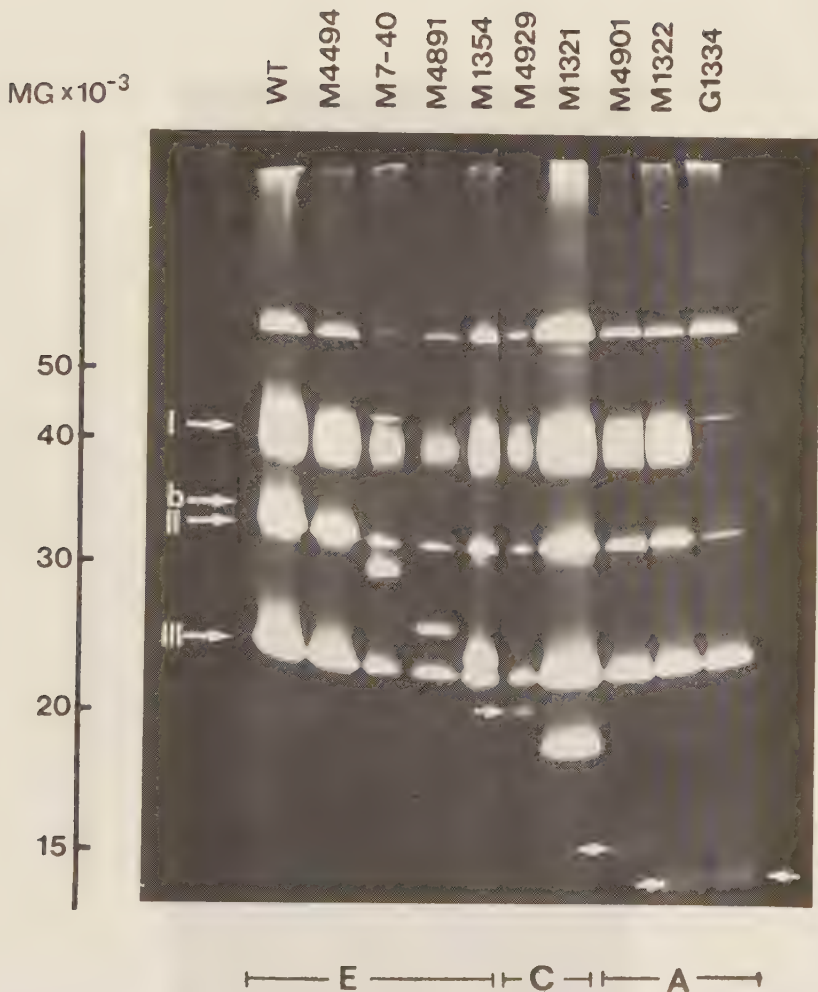


Abb. 10

SDS-Gelelektrophorese (13,5 % Acrylamid) mitochondrialer Translationsprodukte von *cob*⁻ Mutanten aus den Gruppen A, C und E.

Die Anordnung im Gel erfolgte entsprechend der Position der Mutationsorte der Mutanten in der genetischen Karte (Abb. 21a).

I, II, III bezeichnen die Untereinheiten der Cytochrom *c* Oxidase; b bezeichnet das Apocytochrom *b*. Die weissen Pfeile kennzeichnen Banden, die in der Reproduktion nur schwach sichtbar sind. Im Originalautoradiogramm sind sie eindeutig zu erkennen.

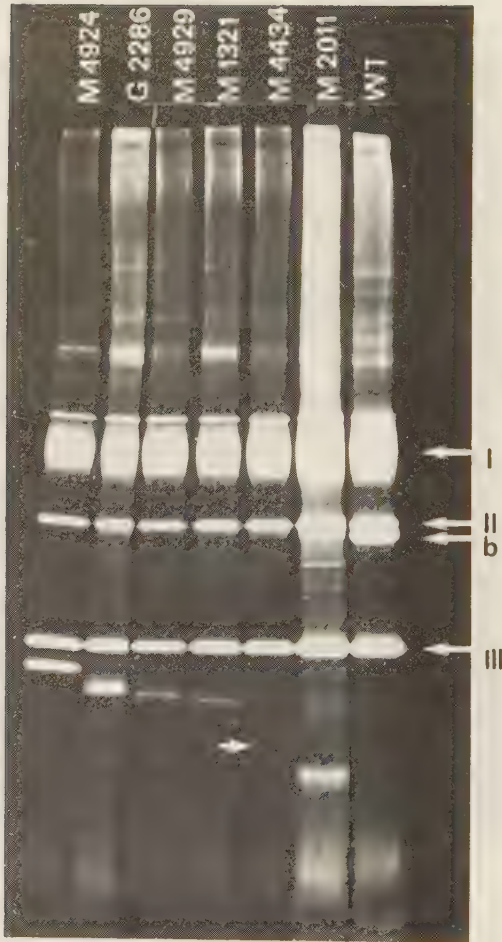


Abb. 11

SDS-Gelelektrophorese mitochondrialer Translationsprodukte von cob^- -Mutanten aus der Gruppe C. Die Auftrennung erfolgte in 10 - 15 % Gradientengelen. Weitere Details siehe Legende zu Abb. 10.

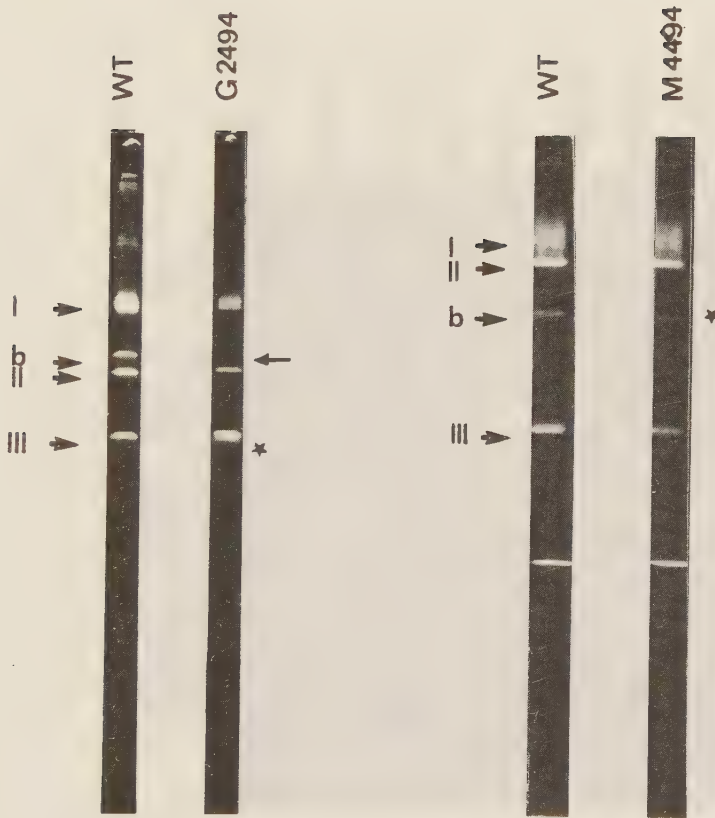


Abb. 12

Mitochondriale Translationsprodukte der cob^- -Mutanten G2494 und M4494.

Die SDS-Gelelektrophorese erfolgte in Gradientengelen; 15 - 20% Acrylamid (links) bzw. 7,5 - 12,5% Acrylamid (rechts). Weitere Details siehe Legende zu Abb. 9.

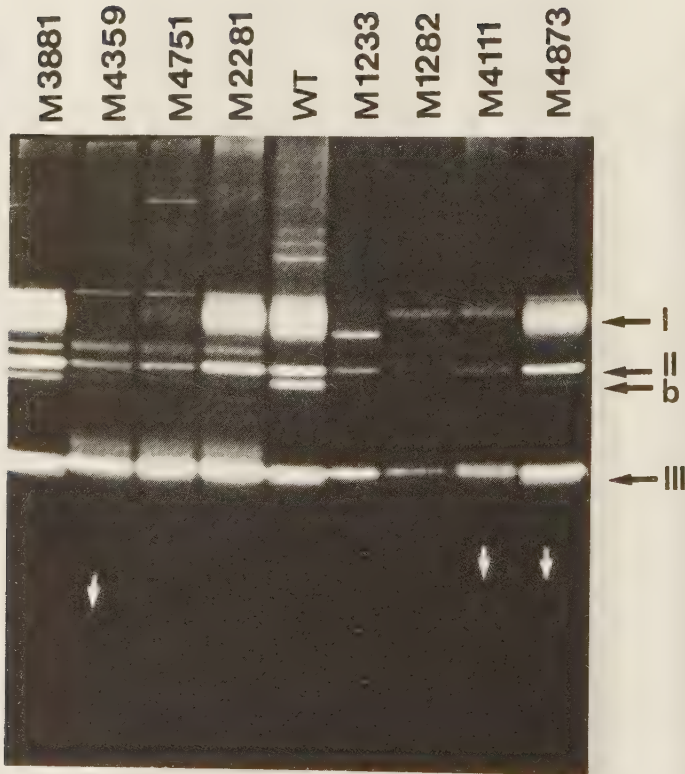


Abb. 13

SDS-Gelelektrophorese mitochondrialer Translationsprodukte der *cob*⁻ Mutanten aus den Gruppen B und D.

A/B kennzeichnet eine Mutante, deren Mutationsort an der Grenze der Gruppen A und B liegt. Weitere Details siehe Legende zu Abb. 10.

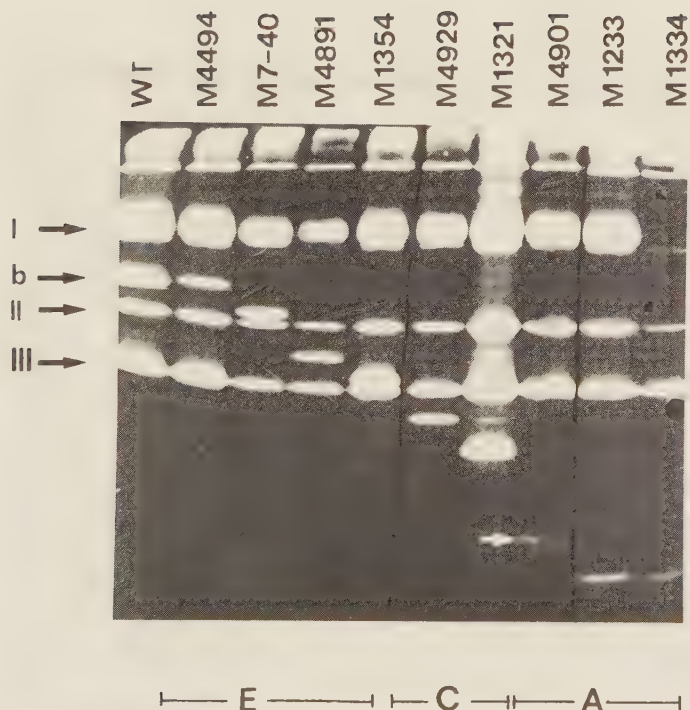


Abb. 14

SDS-Elektrophorese mitochondrialer Translationsprodukte aus cob^- - Mutanten der Gruppen A, C und E bei höherer Acrylamidkonzentration (16,5 %).

Die Reihenfolge der aufgetragenen Mutantenproteine ist mit jener in Abb. 10 identisch.

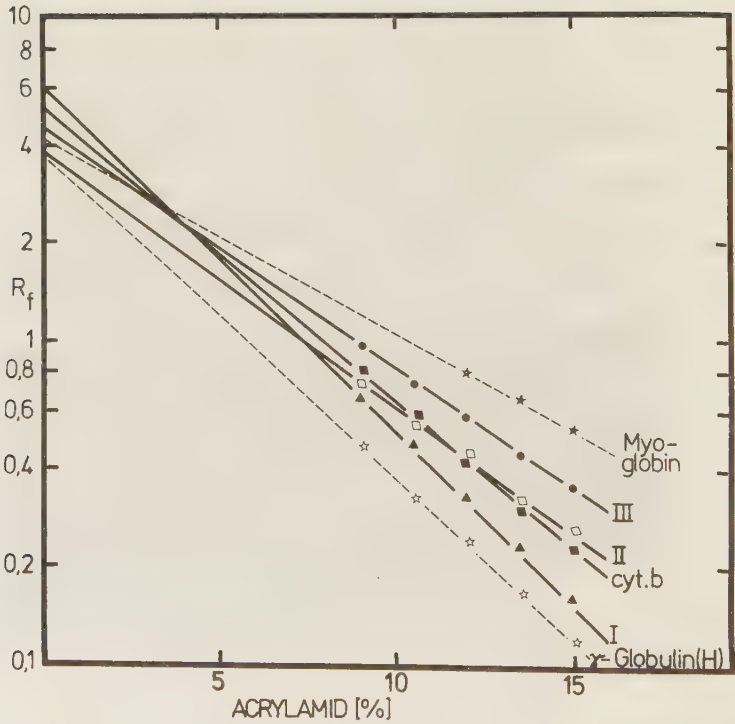


Abb. 15

Ferguson-Plot zur Bestimmung der freien elektrophoretischen Beweglichkeit mitochondrialer Translationsprodukte.

I, II, III, cyt. b bezeichnen die Untereinheiten der Cytochrom c Oxidase bzw. das Apocytochrom b; γ -Globulin (H) bezeichnet die schweren Ketten der γ -Immunglobuline.

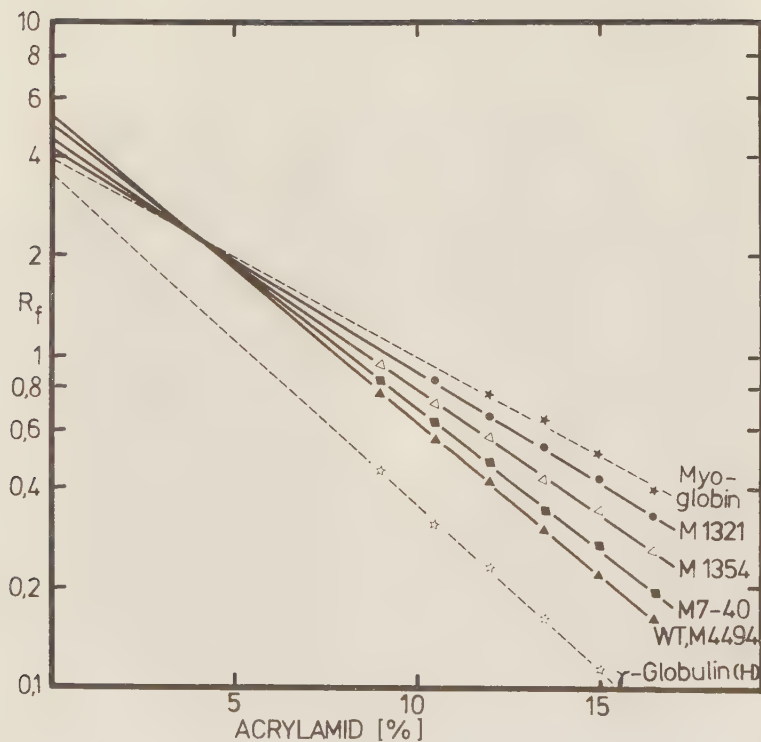


Abb. 16

Ferguson-Plot zur Bestimmung der freien elektrophoretischen Beweglichkeit des Wildtyp-Apocytochroms b und der neu auftretenden Polypeptide der Mutanten M4494, M7-40, M1354 und M1321.

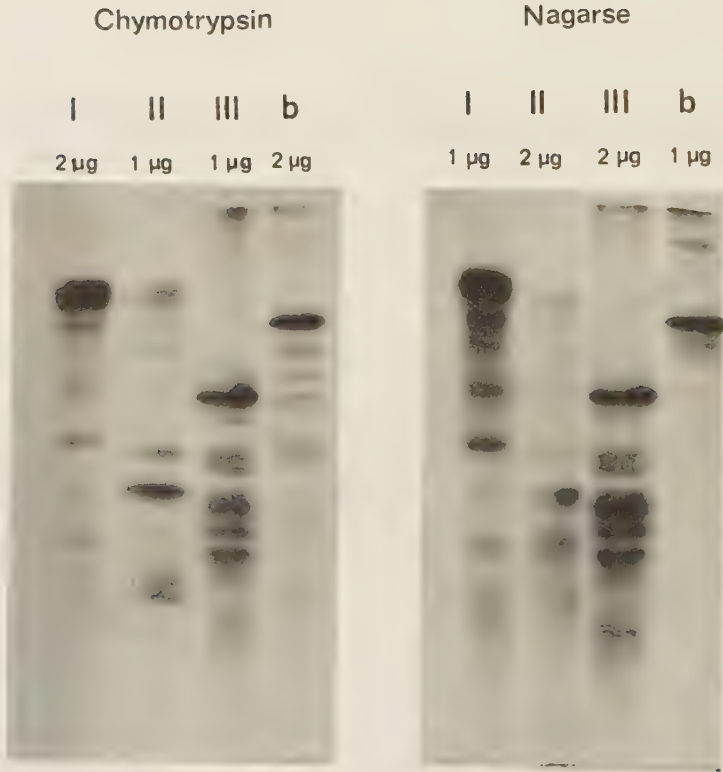


Abb. 17

Unterschiedliches Fragmentierungsmuster nach begrenzter Proteolyse des Apocytochroms b und der Untereinheiten I, II, III der Cytochrom c Oxidase mit Chymotrypsin (links) und Nagarse (rechts). Die Menge der eingesetzten Protease ist über den Geltaschen angegeben.

Chymotrypsin

WT

M4494

4 μ g 20 μ g 100 μ g 100 μ g 20 μ g 4 μ g



Nagarse

M4494

WT

0.5 μ g 5 μ g 50 μ g 50 μ g 5 μ g 0.5 μ g



Abb. 18

Prämentierungsmuster nach begrenzter Proteolyse des Wildtyp-Apocytochroms b und des neuen Polypeptides der Mutante M4494 mit Chymotrypsin (links) und Nagarse (rechts).

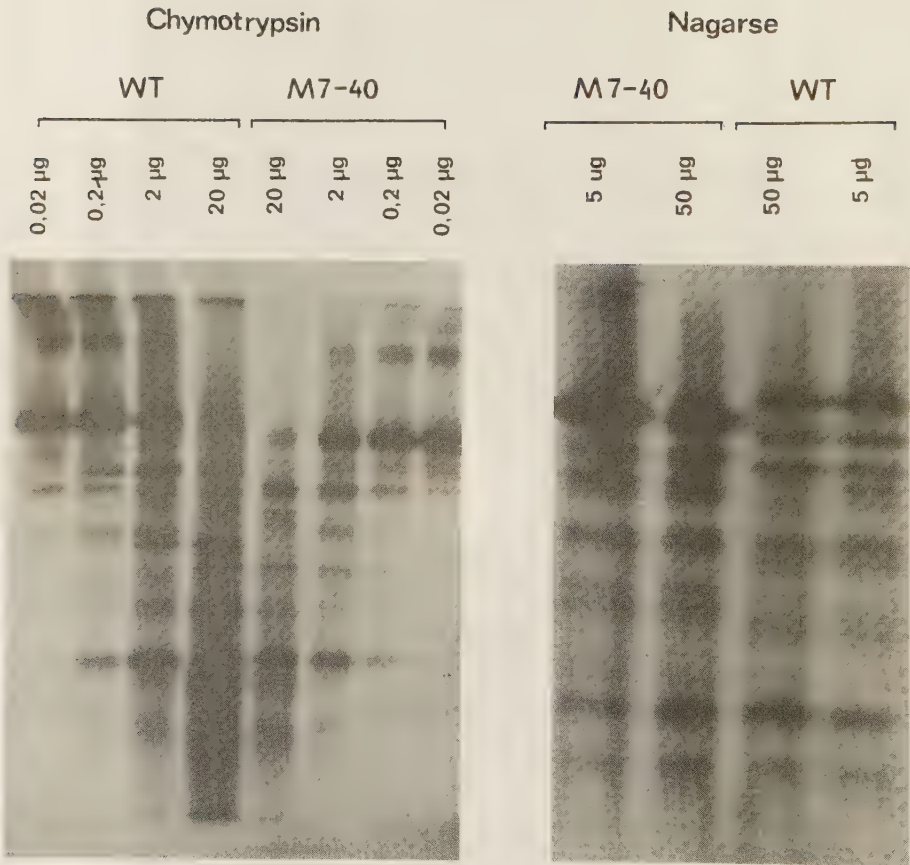


Abb. 19

Fragmentierungsmuster nach begrenzter Proteolyse des Wild-
typ-Apocytochroms b und des neuen Polypeptides der Mutante
M7-40 mit Chymotrypsin (links) und Nagarse (rechts).

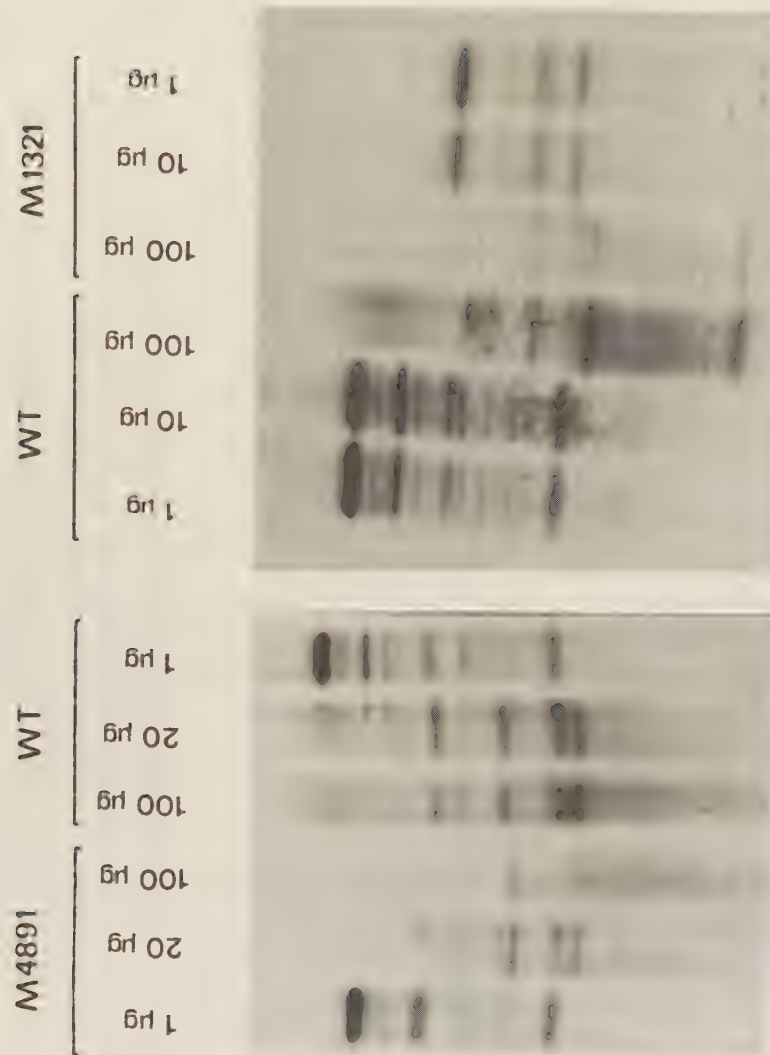


Abb. 20

Fragmentierungsstadium nach begrenzter Proteolyse mit Chymotrypsin des Wildtyp-Apocytosins b und der neuen Polypeptide der Mutanten M4891 (links) und M1321 (rechts). Die Polyaurylamidkonzentration betrug 16,5% (links) und 20% (rechts). Das rechts dargestellte Gel wurde beim 'Freezen' leicht beschädigt.

F. Zusammenfassung

Die Beziehung zwischen der COB-Region der mitochondrialen DNS und dem Cytochrom b Apoprotein wurde an mitochondrialen Mutanten der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Diese cob^- - Mutanten zeigen einen Ausfall des funktionsfähigen Cytochroms b. Die Versuche zur biochemischen Analyse der in vitro bzw. der in vivo synthetisierten Genprodukte führten zu nachstehenden Resultaten und Schlüssen:

- 1.) Mitochondriale RNS stimuliert die Synthese diskreter Polypeptide in einem zellfreien System aus *E. coli*.
- 2.) Über 90 % der in vitro inkorporierten Radioaktivität erscheint in Polypeptiden mit einem MG kleiner als 30 000. Keines dieser Produkte stimmt in der elektrophoretischen Beweglichkeit mit einem der in vivo gebildeten mitochondrialen Translationsprodukten überein.
- 3.) Antiseren gegen Cytochrom c Oxidase sowie gegen mitochondriale Membranproteine präzipitieren spezifisch einen Anteil der in vitro synthetisierten Produkte. Alle vom Anti-Membran-Serum gefällten Polypeptide sind kleiner als 15 000 Dalton. Die in vitro Synthese des Apocytochroms b bzw. seiner antigener Determinanten konnte wegen des Fehlens eines monospezifischen Antiserums nicht nachgewiesen werden.
- 4.) Die mitochondrialen Translationsprodukte von 35 cob^- - Mutanten wurden analysiert. Im Vergleich zum Wildtyp fehlt nahezu allen Mutanten das mitochondrial synthetisierte Apocytochrom b. In 17 Mutanten erscheint statt dessen ein neues Polypeptid im Molekulargewichtsbereich zwischen 13 000 und 30 500
- 5.) Neu auftretende Polypeptide konnten als Fragmente des Apocytochroms b identifiziert werden. Das Molekulargewicht dieser Fragmente ist bestimmt durch den Kartierungsort der entspre-

chenden Mutation und nimmt in der Richtung von OLI 2 nach OLI 1 zu. Dies stützt die Annahme, dass die COB-Region das Strukturgen für ein Apocytochrom b enthält mit einer Transkriptionsrichtung von OLI 2 nach OLI 1.

6.) Die COB-Region weist eine Mosaikstruktur mit mindestens fünf deutlich abgesetzten Abschnitten (A - E) auf, wobei Abschnitt A an den Genort OLI 2 und Abschnitt E an den Genort OLI 1 angrenzen. A, C und E umfassen den codierenden Bereich für das Apocytochrom b. Eingeschoben in diesen Strukturgenbereich sind zwei unabhängige, durch die Abschnitte B und D charakterisierte, Sequenzen mit bisher unbekannter Funktion.

G. Literaturverzeichnis

- Banker, G.A., Cotman, C.A.: Measurement of free electrophoretic mobility and retardation coefficient of protein-sodium dodecyl sulphate complexes by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 247, 5856-5861 (1972)
- Beck, D.E., Gassen, H.G.: Translation of bacteriophage T4 mRNA into active lysozyme by a wheat germ cell-free system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 16-24 (1977)
- Bernardi, G.: Intervening sequences in the mitochondrial genome. *Nature* 276, 558-559 (1978)
- Bonner, W.A., Laskey, R.A.: A film detection method for tritium-labelled protein and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46, 83-88 (1974)
- Borst, P.: Mitochondrial nucleic acids. *Ann. Rev. Biochem.* 41, 333-376 (1972)
- Borst, P., Bos, J.L., Grivell, L.A., Groot, G.S.P., Heyting, C., Moorman, A.F.M., Sanders, J.P.M., Talen, J.L., Van Kreijl, C.F., Van Ommen, G.J.B.: The physical map of yeast mitochondrial DNA anno 1977. In: *Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria* (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.). Berlin: De Gruyter, pp. 213-254 (1977)
- Bos, J.L., Heyting, C., Borst, P., Arnberg, A.C., Van Bruggen, E.F.J.: An insert in the single gene for the large ribosomal RNA in yeast mitochondrial DNA. *Nature* 275, 336-337 (1978)
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)
- Brawerman, G.: Eucaryotic messenger RNA. *Ann. Rev. Biochem.* 43, 621-642 (1974)
- Cabral, F., Solioz, M., Rudin, Y., Schatz, G., Clavilier, L., Slonimski, P.P.: Identification of the structural gene for yeast cytochrome c oxidase subunit II on mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* 253, 297-304 (1978)
- Claisse, M.L., Spyridakis, A., Slonimski, P.P.: Mutations at any one of the three unlinked mitochondrial genetic loci BOX1, BOX4 and BOX6, modify the structure of cytochrome *b* polypeptide(s). In: *Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria* (Bandlow, W., Schweyen, R.J.,

- Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.). Berlin: De Gruyter, pp. 337 - 344 (1977)
- Claisse, M.L., Spyridakis, A., Wambier-Kluppel, M.L., Pajot, P., Slonimski, P.P.: Mosaic organisation and expression of the mitochondrial DNA region controlling cytochrome c reductase and oxidase (II.). In: Biochemistry and Genetics of Yeast (Bacila, B., Horecker, B.L., Stoppani, A.O.M., eds.). New York: Academic press, in press (1978)
- Cleveland, D.W., Fisher, S.G., Kirschner, M.W., Laemmli, U.K.: Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulphate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 252, 1102 - 1106 (1977)
- Colson, A.M., Slonimski, P.P.: Mapping of drug resistant loci in the coenzyme QH₂ cytochrome c reductase region of the mitochondrial DNA map in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.). Berlin: De Gruyter, pp. 185 - 198 (1977)
- Darnell, J.E.: Implications of RNA · RNA splicing in evolution of eukaryotic cells. Science 202, 1257 - 1260 (1978)
- Davies, J.W., Kaesberg, P.: Translation of virus mRNA: Synthesis of bacteriophage Q β proteins in a cell-free extract from wheat embryo. J. Virol. 12, 1434 - 1441 (1973)
- Duesberg, P.H., Vogt, P.H.: Gelelectrophoresis of avian leukosis and sarcoma viral RNA in formamide: Comparison with other viral and cellular RNA species. J. Virol. 12, 594 - 599 (1973)
- Douglas, M., Butow, R.A.: Variant forms of mitochondrial translation products in yeast: evidence for location of determinants on mitochondrial DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 1083 - 1086 (1976)
- Ebner, E., Mason, T.L., Schatz, G.: Mitochondrial assembly in respiration-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 248, 5369 - 5378 (1973)
- Faye, G., Dennebouy, N., Kujawa, Ch., Jacq. C.: Inserted sequences in the mitochondrial 23S ribosomal RNA gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Molec. gen. Genet. 168, 101 - 109 (1979)
- Gielkens, A.L.J., Salden, M.H.L., Bloemendal, H., Konings, R.N.H.: Translation of oncogenic viral RNA and eukaryotic messenger RNA in the *E.coli* cell-free system. FEBS Letters 28, 348 - 352 (1972)

- Greenblatt, J.F., Allet, B., Weil, R.: Synthesis of the tumor antigen and the major capsid protein of Simian Virus 40 in a cell-free system derived from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 108, 361-379 (1976)
- Grivell, L.A., Moorman, A.F.M.: A structural analysis of the oxi-3 region on yeast mtDNA. In: *Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria* (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.). Berlin: De Gruyter, pp. 371-384 (1977)
- Grivell, L.A., Reijnders, L., Borst, P.: The effect of temperature and ionic strength on the electrophoretic mobility of yeast mitochondrial DNA. *Eur. J. Biochem.* 19, 64-72 (1971)
- Groot, G.S.P., Flavell, R.A., Van Ommen, G.J.B., Grivell, L.A.: Yeast mitochondrial RNA does not contain poly(A). *Nature* 252, 167-169 (1974)
- Groot, G.S.P., van Harten-Loosbroek, N.: The use of isolated mitochondria in the study of the mitochondrial biogenesis in yeast. In: *Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria* (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Thomas, D.Y., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.). Berlin: De Gruyter, pp. 241-258 (1976)
- Groot, G.S.P., Grivell, L.A., van Harten-Loosbroek, N., Kreike, J., Moorman, A.F.M., Van Ommen, G.J.B.: The role of the mitochondrial inner membran. In: *Structure and Function of Energy-Transducing Membranes* (Van Dam, K., Van Gelder, B.F., eds.). Amsterdam: North-Holland, in press (1978)
- Groot Obbink, D.J., Hall, R.M., Linnane, A.W., Lukins, H.B., Monk, B.C., Spithill, T.W., Trembath, M.K.: Mitochondrial genes involved in the determination of mitochondrial membrane proteins. In: *The Genetic Function of Mitochondrial DNA* (Saccone, C., Kroon, A.M., eds.). Amsterdam: North-Holland pp. 163-173 (1976)
- Haid, A., Schweyen, R.J., Bechmann, H., Kaudewitz, F., Solioz, M., Schatz, G.: The mitochondrial COB-Region in yeast codes for apocytochrome b and is mosaic. *Eur. J. Biochem.* 94, 451-464 (1979)
- Hartley, M.R., Wheeler, A., Ellis, R.J.: Protein synthesis in chloroplasts. V. Translation of messenger RNA for the large subunit of fraction I protein in a heterologous cell-free system. *J. Mol. Biol.* 91, 67-77 (1975)
- Katan, M.B., van Harten-Loosbroek, N., Groot, G.S.P.: The cytochrome bc₁ complex of yeast mitochondria. Sites of translation of the polypeptides in vivo. *Eur. J. Biochem.* 70, 409-417 (1976)

- Konings, R.N.H., Ward, R., Francke, B., Hofschneider, P.H.: Gene order of RNA bacteriophage M 12. *Nature* 226, 604 - 607 (1970)
- Kotylak, Z., Slonimski, P.P.: Joint control of cytochromes a and b by a unique mitochondrial DNA region comprising for genetic loci. In: *The genetic Function of Mitochondrial DNA* (Saccone, C., Kroon, A.M., eds.). Amsterdam: North-Holland, pp. 143 - 155 (1976)
- Kotylak, Z., Slonimski, P.P.: Mitochondrial mutants isolated by a new screening method based upon the use of the nuclear mutation op1. In: *Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria* (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.). Berlin: De Gruyter, pp. 161 - 172 (1977)
- Kováčová, V., Irmmlerová, J., Kováč, L.: Oxydative phosphorylation in yeast. IV. Combination of a nuclear mutation affecting oxidative phosphorylation with cytoplasmic mutation to respiratory deficiency. *Biochim. Biophys. Acta* 162, 157 - 163 (1968)
- Kroon, A.M., Terpstra, P., Holtrop, M., de Vries, H., van den Bogert, C., de Jonge, J., Agsteribbe, E.: The mitochondrial RNAs of *Neurospora crassa*: Their function in translation and their relation to the mitochondrial genome. In: *Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria* (Bücher, Th., Neupert, W., Sebald, W., Werner, S., eds.). Amsterdam: North-Holland, pp. 685 - 696 (1976)
- Küntzel, H., Blosssey, H.-Ch.: Translation products in vitro of mitochondrial messenger RNA from *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* 47, 165 - 171 (1974)
- Küntzel, H., Pieniazék, N.J., Pieniazék, D., Leister, D.E.: Lipophilic proteins encoded by mitochondrial and nuclear genes in *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* 54, 567 - 575 (1975)
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 227, 680 - 685 (1970)
- Levine, B.: *Genexpression Vol. III: Plasmids and Phages*. New York: John Wiley & Sons (1977)
- Lloyd, P.: *The Mitochondria of Microorganisms*. London: Academic Press (1974)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 - 275 (1951)

- Mahler, H.R., Hanson, D., Miller, D., Bilinski, T., Ellis, D.M., Alexander, N.J., Perlman, P.S.: Structural and regulatory mutations affecting mitochondrial gene products. In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.). Berlin: De Gruyter, pp. 345 - 370 (1977)
- Mason, T.L., Schatz, G.: Cytochrome c oxidase from bakers' yeast. II. Site of translation of the protein components. J. Biol. Chem. 248, 1355 - 1360 (1973)
- Mason, T.L., Poyton, R.O., Wharton, D.C., Schatz, G.: Cytochrome c oxidase from bakers' yeast. I. Isolation and properties. J. Biol. Chem. 248, 1346 - 1354 (1973)
- Matoon, J.R., Balcavage, W.X.: Properties of Saccharomyces cerevisiae mitochondria prepared by a mechanical method. Biochim. Biophys. Acta 153, 521 - 530 (1968)
- Moorman, A.F.M., Grivell, L.A.: Polysomes associated with yeast mitochondria: Evidence for a cell-sap origin. In: Molecular biology of Nucleocytoplasmic relationships (Puisseux-Dao, S., ed.). Amsterdam: Elsevier, pp. 61 - 67 (1975)
- Moorman, A.F.M., Grivell, L.A., Katan, M.B., Van Ommen, D.J.B., Meiland, C.M.: Translation of mitochondrial messenger RNAs in vitro as an approach to the identification of gene products of yeast mitochondrial DNA. In: Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Thomas, D.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.). Berlin: De Gruyter, pp. 241 - 258 (1976a)
- Moorman, A.F.M., Lamie, F., Grivell, L.A.: A coupled transcription - translation system derived from Escherichia coli: The use of immobilized deoxyribonuclease to eliminate endogenous DNA. FEBS Letters 71, 67 - 72 (1976b)
- Moorman, A.F.M., Verkley, F.N., Asselbergs, F.A.M., Grivell, L.A.: Yeast mitochondrial messenger RNA is not correctly translated in heterologous cell-free systems. In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.). Berlin: De Gruyter, pp. 385 - 400 (1977)
- Moorman, A.F.M., Van Ommen, G.J.B., Grivell, L.A.: Transcription in yeast mitochondria: Isolation and physical mapping of messenger RNAs for subunits of cytochrome c oxidase and ATPase. Molec. gen. Genet. 160, 13 - 24 (1978a)
- Moorman, A.F.M., Grivell, L.A., Lamie, F., Smits, H.L.: Identification of mitochondrial gene products by DNA-directed protein synthesis in vitro. Biochim. Biophys. Acta 518, 351 - 365 (1978b)

- Needleman, R.B., Tzagoloff, A.: Breakage of yeast: A method for the processing multiple samples. *Anal. Biochem.* 64, 545 - 549 (1975)
- Nirenberg, M.W., Matthaei, J.M.: The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47, 1588 - 1602 (1961)
- Ouchterlony, O.: Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: *Handbook of Experimental Immunology* (Weir, D.M., ed.). Oxford: Blackwell Sci. Publ., pp. 655 - 706 (1967)
- Penman, S.: RNA metabolism in the HeLa nucleus. *J. Mol. Biol.* 17, 117 - 130 (1966)
- Pajot, P., Wambier-Kluppel, M.L., Kotylak, Z., Slonimski, P. P.: Regulation of Cytochrome oxidase formation by mutations in a mitochondrial gene for cytochrome b. In: *Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria* (Bücher, Th., Neupert, W., Sebald, W., Werner, S., eds.). Amsterdam: North Holland, pp. 443 - 451 (1976)
- Poyton, R.O., Groot, G.S.P.: Biosynthesis of polypeptides of cytochrome c oxidase by isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 172 - 176 (1975)
- Pratje, E., Michaelis, G.: Resistance to high concentrations of antimycin A in *Saccharomyces cerevisiae*: Synergistic interaction of nuclear and mitochondrial mutations. In: *Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria* (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.). Berlin: De Gruyter, pp. 199 - 204 (1977)
- Prunell, A., Bernardi, G.: The mitochondrial genome of wildtype yeast cells. IV: Genes and spacers. *J. Mol. Biol.* 86, 825 - 841 (1974)
- Riccio, P., Schagger, H., Engel, W.D., von Jagow, G.: bc₁-complex from beef heart: one-step purification by hydroxyapatite chromatography in Triton X-100, polypeptide pattern and respiratory chain characteristics. *Biochim. Biophys. Acta* 459, 250 - 262 (1977)
- Rosen, D., Edelman, M.: Poly(A)-associated RNA from the mitochondrial fraction of the fungus *Trichoderma*. *Eur. J. Biochem.* 63, 525 - 532 (1976)
- Reijnders, L., Kleisen, C.M., Grivell, L.A., Borst, P.: Hybridization studies with yeast mitochondrial RNAs. *Biochim. Biophys. Acta* 272, 396 - 407 (1972)
- Rubin, G.M.: Preparation of RNA and ribosomes from yeast. In:

- Methods of Cell Biology, Vol XII (Prescott, D.M. ed.). New York: Academic Press, pp. 45-64 (1975)
- Rubin, M.S., Tzagoloff, A.: Assembly of the mitochondrial membrane system. IX. Purification, characterization and subunit structure of yeast and beef cytochrome oxidase. J. Biol. Chem. 248, 4269-4274 (1973)
- Sanders, J.P.M., Heyting, C., DiFranco, A., Borst, P., Slonimski, P.P.: The organization of genes in yeast mitochondrial DNA. In: The Genetic Function of Mitochondrial DNA (Saccone, C., Kroon, A.M., eds.). Amsterdam: North Holland, pp. 259-272 (1976)
- Scragg, A.H., Thomas, D.Y.: Synthesis of mitochondrial proteins in an *Escherichia coli* cell-free system directed by yeast mitochondrial DNA. Eur. J. Biochem. 56, 183-192 (1975)
- Scragg, A.H., Eggitt, M.J., Thomas, D.Y.: The synthesis of yeast mitochondrial proteins in cell-free systems. In: Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Thomas, D.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.). Berlin: De Gruyter, pp. 215-240 (1976)
- Schatz, G., Kováč, L.: Isolation of promitochondria from anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. In: Methods in Enzymology, Vol. 31 (Fleischer, S., Packer, L., eds.). New York: Academic Press, pp. 627-632 (1974)
- Schweyen, R.J., Kaudewitz, F.: Proteinsynthesis by yeast mitochondria in vivo. Quantitative estimate of mitochondrially governed synthesis of mitochondrial proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 728-735 (1970)
- Schweyen, R.J., Weiss-Brummer, B., Backhaus, B., Kaudewitz, F.: The genetic map of the mitochondrial genome including the fine structure of COB- and OXI 3 cluster. In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.). Berlin: De Gruyter, pp. 139-148 (1977)
- Schweyen, R.J., Weiss-Brummer, B., Backhaus, B., Kaudewitz, F.: The genetic map of the mitochondrial genome in yeast. Map positions of drug^r and mit⁻ markers as revealed from population analysis of rho⁻ clones in *Saccharomyces cerevisiae*. Molec. gen. Genet. 159, 151-160 (1978)
- Sherman, F., Slonimski, P.P.: Respiration-deficient mutants of yeast. II. Biochemistry. Biochim. Biophys. Acta 90, 1-15 (1964)
- Siebert, W., Konings, R.N.H., Bauer, H., Hofschneider, P.H.: Translation of avian myeloblastosis virus RNA in a cell-free

- lysate of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 888-891 (1972)
- Siebert, W., Bauer, G., Hofschneider, P.H.: Direct evidence for messenger activity of influenza virion RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2960-2963 (1973)
- Sjöquist, J., Forsgren, A., Gustafson, G.T.: Interaction between gamma globulins and protein A from *Staphylococcus aureus*. In: Nobel Symposium Vol. 3 (Killander, J., ed.). Stockholm: Almquist und Wiksell, pp. 341-348 (1967)
- Slonimski, P.P., Tzagoloff, A.: Localization in yeast mitochondrial DNA of mutations expressed in a deficiency of cytochrome oxidase and/or coenzyme QH₂-cytochrome c reductase. Eur. J. Biochem. 61, 27-41 (1976)
- Slonimski, P.P., Pajot, P., Jacq, C., Foucher, M., Perrodin, G., Kochko, A., Lamouroux, A.: Mosaic organisation and expression of the mitochondrial DNA region controlling cytochrome c reductase and oxidase (I) In: Biochemistry and Genetics of Yeast (Barila, M., Horecker, B.L., Stoppani, A.O.M., eds.). New York: Academic Press, in press (1978)
- Stewart, P.R.: Mitochondrial RNA. In: The Ribonucleic Acids (Stewart, P.R., Lehan, D.S., eds.). Berlin: Springer-Verlag, pp. 159-177 (1973)
- Strausberg, R.L., Vincent, R.D., Perlman, P.S., Butow, R.A.: Asymmetric gene conversion at inserted segments on yeast mitochondrial DNA. Nature 276, 577-583 (1978)
- Struhl, K., Cameron, J.R., Davis, R.W.: Functional genetic expression of eukaryotic DNA in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1471-1475 (1976)
- Studier, F.W.: Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. J. Mol. Biol. 79, 237-248 (1973)
- Thomas, D.Y., Williamson, D.H.: Products of mitochondrial protein synthesis in yeast. Nature New Biology 233, 196-199 (1971)
- Thorell, J.I., Johansson, B.G.: Enzymatic Iodination of polypeptides with ¹²⁵I to high specific activity. Biochim. Biophys. Acta 251, 363-369 (1971)
- Tzagoloff, A., Rubin, M.S., Sierra, M.F.: Biosynthesis of mitochondrial enzymes. Biochim. Biophys. Acta 301, 71-104 (1973)
- Tzagoloff, A., Akai, A., Needleman, R.B.: Assembly of the mitochondrial membrane system. Isolation of nuclear and cytoplasmic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with specific defects in mitochondrial functions. J. Bact. 122, 826-831 (1975)

- Tzagoloff, A., Foury, F., Akai, A.: Genetic Determination of the mitochondrial cytochrome b. In: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Bücher, Th., Neupert, W., Sebald, W., Werner, S., eds.). Amsterdam: North Holland, pp. 419 - 426 (1976a)
- Tzagoloff, Foury, F., Akai, A.: Assembly of the mitochondrial membrane system. XVIII. Genetic loci on mitochondrial DNA involved in cytochrome b biosynthesis. Molec. gen. Genet. 149, 33 - 42 (1976b)
- Udenfried, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W., Weigle, M.: Fluorescamine: a reagent for assay of aminoacids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. Science 178, 871 - 872 (1972)
- Van Ommen, G.J.B., Groot, G.S.P.: A transcription map of yeast mitochondrial DNA. In: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of Mitochondria (Bandlow, W., Schweyen, R.J., Wolf, K., Kaudewitz, F., eds.). Berlin: De Gruyter, pp. 415 - 424 (1977)
- Weiss, H., Ziganke, B.: Cytochrome b in *Neurospora crassa* mitochondria. Site of the translation of the heme protein. Eur. J. Biochem. 41, 63 - 71 (1974)

Am Ende dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Kaudewitz für die Anregungen zu diesen Untersuchungen, für die Betreuung während der Experimente sowie für das bereitgestellte, modern ausgerüstete Labor herzlich danken.

Mein Dank gilt ferner:

Herrn Dr. R.J. Schweyen für seine Bereitschaft zur Kooperation, für die zahlreichen Diskussionen und für sein ständiges Interesse an den Versuchsergebnissen.

Herrn Dr. D. Thomas für die Einführung in die Methode der in vitro Proteinsynthese und für wertvolle Hinweise bei experimentellen Problemen.

Herrn Prof. G. Schatz und den Mitarbeitern seiner Gruppe - vor allem Dr. M. Solioz, Dr. T. Fox und Y. Rubin - vom Biozentrum in Basel für die häufigen Diskussionen, Anregungen und Hilfestellungen während meines Gastaufenthaltes.

Herrn Dr. W. Sebald für das Überlassen von Antiseren gegen Cytochrom c Oxidase sowie für seine Anleitung bei der Isolierung dieses Enzyms.

Fräulein K. Watzinger und Fräulein I. Wagner für die gewissenhafte Assistenz bei der Durchführung eines Teils der Versuche und für die Hilfe bei der Anfertigung der Abbildungen.

Allen anderen Mitarbeitern des Institutes, die am Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren, für wertvolle Dienste und nützliche Diskussionen.

LEBENS LAUF

- 1943 geboren in München am 16. Juli
- 1949 - 1954 Volksschule in München
- 1954 - 1960 Oberrealschule in München
- 1960 - 1965 Lehr- bzw. Angestelltenverhältnis bei der Bayerischen Versicherungsbank- Allianz AG
- 1965 - 1968 Münchenkolleg (Zweiter Bildungsweg),
Abitur in München
- 1968 - 1972 Studium der Biologie an der Universität
München
- 1972 - 1974 Diplomarbeit am Genetischen Institut der
Universität München, Studienabschluss mit
Diplom in Biologie
- 1974 Einweisung als Verwalter einer wissen-
schaftlichen Assistentenstelle
- 1975 Beginn der Dissertationsarbeit bei
Professor Kaudewitz
- 1975 Eheschliessung mit Pia Bauer
- 1977 Geburt unseres Sohnes Dirk-Oliver
- 1977 - 1978 Fünfmonatiger Aufenthalt bei Prof. Dr. G.
Schatz, Biozentrum der Universität, Basel
Schweiz

